

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE CORTE DE  
RNA POR LA TOXINA BACTERIANA KID Y DE  
SU ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA  
TRADUCCIÓN.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Elizabeth Diago Navarro**

Bajo la dirección del doctor

Ramón Díaz Orejas

**Madrid, 2010**

- **ISBN: 978-84-693-1836-2**

# **EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE CORTE DEL RNA POR LA TOXINA BACTERIANA KID Y DE SU ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA TRADUCCIÓN**

Tesis Doctoral presentada por la Lda. Elizabeth Diago Navarro, para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



Trabajo realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas  
Consejo Superior de Investigaciones Biológicas,  
con financiación del Programa de Formación de Investigadores del Gobierno Vasco  
(BFI 05.35) y de los proyectos BFU2005-03911 del Mº de Educación y Ciencia, BFU2008-  
01566/BMC y CSD2008-00013 del Mº de Innovación y Ciencia y COMBACT de la  
Comunidad de Madrid



Autora  
Lda. Elizabeth Diago Navarro

Vº Bº Director de Tesis  
Prof. Ramón Díaz Orejas  
CIB-CSIC





*A mis abuelos, mi madre y mi hermano*



*La creatividad nace de la angustia como el  
día nace de la noche. Es en la crisis don-  
de nace la inventiva, los descubrimientos  
y las grandes estrategias. Quien supera  
la crisis se supera a sí mismo sin quedar  
"superado".*

Albert Einstein

*Lo esencial es invisible a los ojos.*

El Principito.  
Antoine de Saint-Exupéry



En primer lugar quisiera agradecer a Ramón toda su ayuda, sus consejos y su guía en esta aventura. Gracias por acogerme con los brazos abiertos en el laboratorio, por la confianza que has depositado en mí y por todo lo que me has enseñado durante todo este tiempo.

Al Dr. Marc Lemonnier por guiarme durante los primeros pasos de este trabajo y sin el cual este trabajo no habría sido el mismo. Gracias por confiar en mí desde el principio y por todos los consejos, que aún estando fuera me transmitiste.

También agradezco a los Drs. Rafael Giraldo y Elena Fernández-Tresguerres por sus valiosos consejos que me ayudaron a mejorar este trabajo.

Gracias al Dr. Antonio Tormo por toda su ayuda al comienzo de mi etapa en Madrid y por haber sido el artífice de que comenzara mi aventura en este laboratorio.

Many thanks to all people from the Department of Mass Spectrometry of the Utrecht University. Prof. Albert Heck and Dr. Robert H. H. van den Heuvel thank you for open me the possibility to work with a completely new technique. I would like to address special thanks to Vera, Arjan, Manuela and Ebru, you made me feel as if I were at home.

I would like to give thanks to Dr. Richard Buckingham laboratory for their collaboration in the characterisation of RF1 mutants.

Agradezco al laboratorio de Álvaro Martínez del Pozo su colaboración y asesoramiento en los estudios de rotura del ARN ribosómico.

Gracias a Juan Pedro Gracia Ballesta y a María y Charo por su ayuda con la realización de los perfiles ribosomales.

Agradezco a los integrantes de mi laboratorio por todo su apoyo. Gracias Ana por haber encontrado en tí una amiga, por tu disposición para ayudarme allí cuando lo necesitaba y por tus inestimables sugerencias durante la escritura del presente trabajo. A Juan por su apoyo, ayuda y ánimos durante este trabajo. A Alicia que aunque se incorporó más tarde ha formado una parte especial de esta aventura, gracias por todo. A Damián que aún siendo el último en llegar al laboratorio ha participado durante las últimas partes de este trabajo. Gracias a María, Fátima, Laura y Ana por los consejos que me habéis aportado y por estar siempre disponibles. Gracias a la Dra. Alicia Prieto y al Dr. Antonio Leal por los ánimos que he recibido de vuestra parte.

Agradezco el apoyo recibido de parte de los laboratorios de los Drs. Manuel Espinosa y Gloria del Solar. En particular, quisiera agradecer a Concha y a Virtu sus recomendaciones en la realización de este trabajo, así como sus divertidas y amenas conversaciones en los momentos de crisis (ay, esos videos caseros). A Fabi, ha sido un placer recorrer juntos la carrera de obstáculos de los últimos meses.

Agradezco a los Drs. José Manuel Andreu y Fernando Díaz los consejos y ayuda que me han aportado. Al igual que a los doctores Pablo Chacón e Isabel Barasorain.

Agradezco toda la ayuda prestada por los servicios comunes del CIB, gracias por hacer que el trabajo sea un poco más fácil.

A Jimena, Quique, Raquel, Sergio, Natalia, Ane, Ana R., Patri V., Óscar, Noelia, Violeta, Noemí, gracias por los buenos ratos que hemos pasado preparando nuestras coreografías. ¡El próximo año ganamos!

Gracias a los nuevos amigos que he encontrado en el CIB, Ruth, Marian, Laura, Sonia, David, Nacho, Mon, Chiara, Sara, Luque, Felicia, María, Abel, Irene, M<sup>a</sup> Ángeles, Ana, Marta, Claudia y Javi. Gracias por estar ahí y por todos vuestros ánimos y por todas las risas que hemos compartido.

Gracias a los mejores amigos que pudiera haber encontrado en Madrid, habéis sido mi apoyo en esta ciudad. A Vanesa gracias por todos los ratos que hemos pasado juntas tanto en Euskadi como en Madrid, he encontrado una amiga, gracias por toda tu ayuda, por las confidencias, me alegra que podamos empezar una nueva aventura juntas. Gracias Mariam por todo lo que has hecho por mí, por estar siempre ahí, por todos tus consejos y por haber tenido una consejera ideal en esta última etapa. Gracias Fernando por haber sido un gran amigo durante todo este tiempo, por tu paciencia con nuestro volumen en casa. Gracias a Joan por tu buen rollo, por tu disposición, te doy especialmente las gracias por tus consejos y aportaciones en la portada de este trabajo. Melisa, aunque ya no estés en Madrid me encantó compartir los primeros momentos en Madrid, gracias por tus ánimos y por hacerme reír tanto. A Luis porque aunque acaba de llegar ha sido paciente escuchando los problemas de la tesis.

Gracias a los compañeros de ERASMUS de Madrid que han compartido todas las etapas de este trabajo, Paco, Ana y Juan habéis sido unos grandes amigos que aunque no nos veamos tanto como nos gustaría, siempre estáis ahí.

También quiero recordar a Xabi y a Itxaso que aunque no nos veamos, cada vez que hablamos es como si no hubiera pasado el tiempo. Gracias por ser unos buenos amigos.

A la família que he trobat a Barcelona. Benet, Blanca, Marina, Enric, Leia i tots els altres gràcies per fer-me sentir com en la meva casa.

Gracias a Blanca, Iratxe y Laura, mis "hermanas" de Vitoria, habéis sido las mejores amigas que hubiera podido pedir. Gracias por haber estado siempre a mi lado, por no rendiros en nuestra amistad y mantenerla como si no hubiera pasado el tiempo.

A Pata por tu apoyo, tus ánimos y por hacer que me sintiera mejor.

Esta tesis no podría haberse hecho realidad si no fuera por el apoyo de mi familia. Gracias a mis abuelos, Agustina y Francisco, a mi madre, Blanca y a mi hermano, Iván. Gracias por haber confiado en mí, por todo lo que habéis sacrificado por mí. No puedo explicar todo lo que significáis para mí. Todo este trabajo va dedicado a vosotros.

Por último, quisiera agradecer a Benet el haber sido mi pilar durante todo este tiempo. Gracias por haber estado conmigo en los ratos malos y buenos, por no rendirte nunca, por asesorarme, por ayudarme a recuperar la sonrisa cuando lo necesitaba. Gracias por haberte convertido en el mejor compañero con el que podía haber soñado.



**Dr. Ramón Díaz Orejas**

*Dep. de Microbiología Molecular y Biología de las infecciones*

Madrid 14 de Septiembre de 2009

La tesis presentada por la Licenciada **Elizabeth Diago Navarro** para optar al título de Doctora conforme a la mención "Doctor Europeo" se titula "Evaluación del mecanismo de corte del RNA por la toxina bacteriana Kid y de su actividad inhibidora de la traducción" y ha sido realizado íntegramente por la doctoranda bajo mi dirección en el Centro de Investigaciones Biológicas y en el Departamento de Espectrometría de Masas de la Universidad de Utrecht que dirige el Profesor Albert Heck.

Los resultados obtenidos suponen un avance sustancial en el entendimiento de la actividad RNasa de la toxina Kid y de su potencial como inhibidor de traducción y han sido publicados en dos revistas internacionales de calidad (Molecular Microbiology y FEBS Journal). En particular se ha validado en buena medida el modelo disponible sobre la unión y mecanismo de corte del RNA por la toxina Kid y se ha establecido una conexión funcional novedosa de esta toxina con el factor de terminación de traducción RF1. Es de subrayar la utilización de la espectrometría de masas nativa para la caracterización de una colección de mutantes de la toxina Kid afectados en residuos significativos en unión y/o ruptura del RNA, cuyos resultados se recogen en el trabajo publicado en FEBS Journal. El uso de esta tecnología que la doctoranda ha aprendido y aplicado en el Departamento de espectrometría de masas de la Universidad de Utrecht supone una aportación novedosa a la comunidad científica de nuestro país.

Elizabeth ha realizado su trabajo con gran dedicación y eficiencia, financiada con una beca del Gobierno Vasco y ha sido también receptora de una beca EMBO para visitar el laboratorio del Prof. A. Heck en la Universidad de Utrecht. La doctoranda ha participado activamente en todas las fases del proceso científico, incluida la escritura de los dos manuscritos publicados. Elizabeth tiene ya, a mi entender, una sólida formación científico y técnica por lo que la considero plenamente capacitada para recibir el Grado de Doctora al que aspira.

*Ramón Díaz Orejas*

DNI: 1345072-D

*(Profesor de Investigación del CSIC)*





## I. ÍNDICES



<b>I.</b>	<b>ÍNDICES</b>	
<b>II.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>23</b>
<b>III.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>27</b>
1	PLÁSMIDOS	29
1.1	Definición, sistemas de mantenimiento y de transferencia.	29
1.2	Sistemas de mantenimiento plasmídicos.	30
2	SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA (T-A)	31
2.1	Familias de sistemas T-A.	33
2.2	Sistemas T-A cromosómicos.	34
2.3	Sistemas T-A implicados en el proceso de traducción.	36
2.3.1	SISTEMA <i>hipBA</i> DEL CROMOSOMA DE <i>E. coli</i>	36
2.3.2	SISTEMA <i>phd-doc</i> DEL PROFAGO P1	37
2.3.3	SISTEMA <i>relBE</i> DEL CROMOSOMA DE <i>E. coli</i>	38
2.3.4	SISTEMA <i>yefM-yoeB</i> DEL CROMOSOMA DE <i>E. coli</i>	40
2.3.5	SISTEMA <i>dinJ-yafQ</i> DEL CROMOSOMA DE <i>E. coli</i>	41
2.3.6	SISTEMA <i>chpA (mazEF)</i> DEL CROMOSOMA DE <i>E. coli</i>	42
2.3.7	SISTEMA <i>parD (kis-kid)</i> DEL PLÁSMIDO R1 DE <i>E. coli</i>	44
3	PROCESO DE TRADUCCIÓN EN PROCARIOTAS	49
3.1	Iniciación.	50
3.2	Elongación.	50
3.3	Terminación.	51
<b>IV.</b>	<b>OBJECTIVES</b>	<b>53</b>
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>57</b>
1	MATERIALES	59
1.1	Cepas bacterianas.	59
1.2	Plásmidos.	59
1.3	Productos químicos.	62
1.4	Enzimas de restricción de ADN y ARN.	62
1.5	Mutagénesis del ADN.	63
1.6	Tampones y soluciones.	63
1.7	Medios de cultivo.	65
1.8	Isótopos radioactivos.	66
1.9	Material autorradiográfico.	66
1.10	Oligonucleótidos.	66

1.11	Secuenciación.	68
1.12	Programas informáticos.	68
<b>2</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>69</b>
2.1	Cultivo y conservación de <i>E. coli</i> .	69
2.2	Transformación de <i>E. coli</i> .	69
2.3	Manipulación general de ADN.	69
2.4	Manipulación general de ARN.	71
2.5	Técnicas generales con proteínas.	72
2.6	Técnicas de marcaje radioactivo.	73
2.7	Reacciones de corte del ARN con Kid.	74
2.8	Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa.	75
2.9	Aislamiento de mutantes espontáneos no tóxicos de la proteína Kid.	75
2.10	Ensayos de <i>Western Blot</i> .	76
2.11	Ensayos de retardo en gel.	76
2.12	Espectrometría de masas (EM).	76
2.13	Análisis de los datos de espectrometría de masas.	79
2.14	Análisis estadístico de los datos.	79
2.15	Ensayos de toxicidad.	79
2.16	Ensayos de complementación.	80
2.17	Dicroísmo Circular (DC).	80
2.18	Obtención de perfiles ribosomales.	81
2.19	Espectrofluorometría.	81
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>83</b>
<b>1</b>	<b>EVALUACIÓN DEL MODELO DE UNIÓN Y CORTE DEL ARN POR LA TOXINA KID</b>	<b>85</b>
1.1	Obtención de proteínas Kid mutantes.	85
1.2	Análisis de la estabilidad y de la estructura de las proteínas mutantes.	90
1.3	Las mutaciones introducidas en la toxina no afectan la capacidad de formar complejos con la antitoxina.	91
1.4	Los complejos formados por las proteínas Kid mutantes y Kis tienen capacidad de unión a ADN.	94
1.5	Las mutaciones en Kid no afectan a la capacidad de regulación del operón <i>parD</i> .	97
1.6	Identificación de residuos implicados en la unión de Kid al sustrato de ARN.	98
1.7	Las mutaciones que afectan a residuos del centro activo impiden la rotura del ARN pero no la unión al mismo.	105

1.8	Los efectos de las mutaciones sobre la actividad ARNasa se reflejan en la inhibición de síntesis de proteínas.	107
1.9	La toxicidad de la proteína Kid silvestre y mutantes se correlaciona con la inhibición de síntesis de proteínas y con su actividad ARNasa.	109
2	IMPLICACIÓN DE LA TOXINA KID EN EL PROCESO DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS	111
2.1	Aislamiento de mutantes cromosómicos resistentes a la toxina Kid.	111
2.2	Los mutantes <i>prfA</i> sólo pueden complementar una mutación <i>prfA(ts)</i> si están sobreexpresados.	112
2.3	La disminución de la terminación de la traducción <i>in vivo</i> conduce a la lectura a través de los codones de terminación en el proceso de traducción ( <i>readthrough</i> ).	113
2.4	Las mutaciones en <i>prfA</i> reducen la actividad de terminación específica de RF1 en los codones UAG.	115
2.5	Las mutaciones en el gen <i>prfA</i> confieren hipersensibilidad a las toxinas Kid y RelE.	118
2.6	Las mutaciones en <i>prfA</i> producen hipersensibilidad a los antibióticos aminoglicósidos.	121
3	ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LA PROTEÍNA KID CON EL RIBOSOMA	123
3.1	Kid produce roturas en el ARN ribosómico pero éstas no inactivan al ribosoma.	123
3.2	Estudio de las interacciones de Kid con el ribosoma.	126
VII.	DISCUSIÓN	135
1	VALIDACIÓN DEL MODELO DE UNIÓN Y CORTE DEL ARN POR LA TOXINA KID	137
2	IMPLICACIÓN DE LA TOXINA KID EN EL PROCESO DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS	142
3	ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LA PROTEÍNA KID CON EL RIBOSOMA	147
VIII.	CONCLUSIONS	151
IX.	BIBLIOGRAFÍA	155
X.	ANEXOS	173

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Organización genética y funcional de los sistemas T-A tipo II.	32
Figura 2.- Estructura de la toxina RelE de la arquea <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3.	40
Figura 3.- Organización genética y funcional del sistema <i>parD</i> ( <i>kis</i> , <i>kid</i> ).	45
Figura 4.- Mecanismos de corte de la toxina Kid.	47
Figura 5.- Modelo de la interacción del ARN con la toxina Kid en una de sus superficies de unión.	48
Figura 6.- Residuos de la toxina Kid que participan en la unión o en el corte del ARN.	49
Figura 7.- Esquema de las principales etapas del proceso de elongación de la traducción.	51
Figura 8.- Representación esquemática de los principales pasos que ocurren en la terminación de la traducción.	52
Figura 9.- Esquema de la ionización y análisis y detección de las muestras en la espectrometría de masas.	78
Figura 10.- Esquema de la localización de las mutaciones encontradas en los genes <i>kis</i> y <i>kid</i> .	89
Figura 11.- Niveles intracelulares y perfiles de dicroísmo circular (DC) de los diferentes mutantes.	91
Figura 12.- Patrón de formación de complejos Kis-Kid de las diferentes proteínas Kid silvestre y mutantes.	92
Figura 13.- Formación de complejos Kis-Kid- <i>parD</i> por las proteínas Kid silvestre y mutantes.	94
Figura 14.- Interacción de Kis y las diferentes proteínas Kid, silvestre y mutantes, con la región promotora del sistema <i>parD</i> .	96
Figura 15.- Niveles de regulación del promotor <i>parD</i> detectadas por la actividad $\beta$ -galactosidasa.	97
Figura 16.- Espectro de masas obtenido para la unión de la proteína Kid silvestre con el ARN 5'-AdUACA-3'.	98
Figura 17.- Efecto de las mutaciones en <i>kid</i> sobre la capacidad de las proteínas de unirse al ARN, medidas por espectrometría de masas nativa.	99
Figura 18.- Efecto de las mutaciones en Kid sobre la capacidad de corte de ARN medido por espectrometría de masas.	100
Figura 19.- Progresión de las reacciones de corte del ARN 5'-UUACU-3' por las proteínas Kid silvestre y mutantes, analizada mediante espectrometría de masas, donde se detectan el ARN no catalizado y los productos derivados de la reacción.	101
Figura 20.- Ensayo <i>in vitro</i> del corte del ARN CopT por la toxina Kid y sus mutantes.	102
Figura 21.- Ensayo <i>in vitro</i> del corte del ARN CopT por la toxina Kid y sus mutantes en extractos de <i>E. coli</i> .	103

Figura 22.- Unión y corte del ARN por las proteínas Kid silvestre, KidT46G/T69G, KidA55G/T69G.	104
Figura 23.- Unión y corte del ARN por las proteínas Kid silvestre, KidD75E, KidD75N, KidH17P y KidR73H.	105
Figura 24.- Ensayo <i>in vitro</i> del corte del ARN CopT por la toxina Kid y sus mutantes.	106
Figura 25.- Ensayos de inhibición de síntesis de proteínas con los diferentes mutantes.	108
Figura 26.- Cultivabilidad de las diferentes cepas conteniendo las proteínas Kid mutantes y silvestre.	110
Figura 27.- Ensayos de complementación de una mutación <i>prfA</i> termosensible.	113
Figura 28.- Lectura a través de la mutación ámbar <i>kis74</i> en la cepa KR19 <i>in vivo</i> .	114
Figura 29.- Eficiencia y niveles del RF1 en las cepas mutantes en <i>prfA</i> <i>in vivo</i> .	116
Figura 30.- Hipersensibilidad de la cepa mutante <i>prfA</i> KR19 a las toxinas Kid y RelE y su neutralización por la sobreexpresión de los genes de sus respectivas antitoxinas o de <i>prfA</i> silvestre.	119
Figura 31.- Inhibición de la síntesis de proteínas <i>in vivo</i> por las toxinas Kid y RelE.	120
Figura 32.- Toxicidad de las proteínas Kid y KidH17P en las cepas silvestre MC1061 y mutante <i>prfA</i> KR19.	121
Figura 33.- Ensayos de sensibilidad a diferentes antibióticos de las cepas KR19 ( <i>prfA303</i> ) y silvestre, MC1061.	122
Figura 34.- Ensayo de la actividad ribonucleolítica de Kid sobre ribosomas eucariotas.	124
Figura 35.- Ensayo de inhibición de síntesis de proteínas mediado por Kid en eucariotas y procariotas.	125
Figura 36.- Emisión de fluorescencia de los extractos celulares de MC1061 conteniendo los plásmidos pFUS2, pY104 ( <i>eyfp</i> ) y pELI10 ( <i>eyfp-kid</i> ).	127
Figura 37.- Ensayos de toxicidad de la cepa MC1061 conteniendo los plásmidos pFUS2, pY104 ( <i>eyfp</i> ), pELI10 ( <i>eyfp-kid</i> ) y pFUSKid ( <i>kid</i> ).	128
Figura 38.- Perfiles ribosomales y fluorescencia de las fracciones de los perfiles ribosomales.	129
Figura 39.- Inhibición de la síntesis de proteínas mediada por las diferentes proteínas Kid.	131
Figura 40.- Espectros de dicroísmo circular de las proteínas Kid silvestre y KidC74SC111-Alexa.	131
Figura 41.- Inhibición de síntesis de proteínas por Kid silvestre y Kid-Alexa.	132
Figura 42.- Espectros de dicroísmo circular de las proteínas Kid silvestre y Kid-Alexa.	133
Figura 43.- Posiciones de las mutaciones en el factor RF1 en relación a los dominios y motivos de secuencia importantes en su funcionalidad.	143



Figura 44.- Componentes ribosomales y el ARNm cercanos a los residuos mutantes en RF1.

**145**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Familias de sistemas toxina-antitoxina en base a la secuencia de aminoácidos de su toxina.	33
Tabla 2.- Estirpes bacterianas utilizadas en esta tesis.	59
Tabla 3.- ADNs plasmídicos utilizados en este trabajo.	59
Tabla 4.- Oligonucleótidos de ADN y ARN utilizados en este trabajo.	66
Tabla 5.- Mutantes espontáneos encontrados en los plásmidos pAB1120 y pAB17.	86
Tabla 6.- Estequiometría de los complejos Kis-Kid obtenidos para la proteína Kid silvestre.	92
Tabla 7.- Eficiencia de terminación en codones UAG y cantidades de RF1 en las cepas <i>prfA</i> mutantes.	117

## ABREVIATURAS Y TERMINOS ANGLOSAJONES

Å	Ångstrom
A	absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNnc	ARN no cortado
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ATP	adenosín trifosfato
BSA	albúmina de suero vacuno
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
Cm	cloranfenicol
CMI	concentración mínima inhibitoria
CPM	cuentas por minuto
col.	colaboradores
DC	dicroísmo circular
DEPC	dietilen pirocarbonato
EDTA	sal disódica del ácido etilendiamino-tetracético
EM	espectrometría de masas
EMSA	ensayos de retardo en gel
ESI	ionización en electrospray
EYFP	proteína amarilla fluorescente mejorada
<i>fitness</i>	eficacia biológica
GDP	guanosina difosfato
GFP	proteína verde fluorescente
Gm	gentamicina
GTP	guanosín trifosfato
GTPasa	actividad guanosín trifosfatasa
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
his	etiqueta de histidinas
<i>hotspot</i>	punto caliente
IPTG	isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	kiloDaltons
Lac	lactosa
LBT	Luria Bertani timina
m/z	masa/carga
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
NA	ácido nalidíxico

<i>Northern blot</i>	ensayo de transferencia de ARN a membrana y detección con sonda de ADN
<b>ORF</b>	marco de lectura abierto
<b>PAGE</b>	electroforesis en geles de poliacrilamida
<b>Par</b>	paromomicina
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>psi</b>	unidad de presión, libras por pulgada cuadrada
<b>PVDF</b>	polivinildenofluoruro
<b>Q-sefarosa</b>	aminas cuaternarias-sefarosa
<i>quorum sensing</i>	detección de quórum
<i>readthrough</i>	lectura a través de un determinado codón
<b>RF</b>	factor de terminación de la traducción
<b>Rif</b>	rifampicina
<b>RMN</b>	resonancia magnética nuclear
<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>sp</b>	especie
<b>SP-sefarosa</b>	sulfo propil-sefarosa
<b>SRL</b>	lazo sarcina ricina
<b>T-A</b>	toxina-antitoxina
<b>Tc</b>	tetraciclina
<b>TCEP</b>	tris-(2-carboxietilo)-fosfina
<b>Tm</b>	temperatura de fusión
<b>TOF</b>	tiempo de vuelo
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>V</b>	voltios
<i>Western blot</i>	ensayo de transferencia de proteínas a membrana y detección por anticuerpos



## II. SUMMARY



Kid, the toxin of the *parD* (*kis*, *kid*) maintenance system of plasmid R1 is an endo-ribonuclease that preferentially cuts RNA at the 5' of A in the core sequence 5'-UA(A/C)-3' and inhibits protein synthesis. A mechanism of the RNase activity of this toxin has been proposed based in the analysis of RNA cleavage products and in a model of the structure of an RNA substrate with the Kid toxin. The model tentatively identified residues of the catalytic site and others involved in general and specific binding of the Kid toxin to an RNA substrate. Inhibition of protein synthesis by Kid is supposed to be the consequence of a ribosome independent cleavage of mRNA. In this thesis we aimed to evaluate the model on the binding and cleavage of RNA by the Kid toxin analysing the effect of specific mutations affecting key residues proposed by the model. We also aimed to analyze the possible involvement of the releasing factor RF1 in the activity of the toxin as protein synthesis inhibitor with the help of novel mutants in the gene of this factor that were previously isolated in our laboratory.

A evaluation of the model was required as the structure of the Kid toxin and the RNA substrate was a model relaying on the docking of an RNA substrate on the protein. This evaluation was performed by native mass spectrometry, a novel non-disruptive development of mass spectrometry that allowed the identification of protein-protein and protein-nucleic acids complexes in solution at physiological pH. Using this methodology, which is particularly useful for comparisons of the different mutational variants of the same protein, we analysed the effects on RNA binding and cleavage of specific mutations in some of the key residues identified by the model. A collection of Kid proteins containing single changes in residues of the proposed catalytic site, R73H, D75E, D75N and H17P were isolated and purified. *In vivo* analysis showed that the mutations abolished the toxicity of the Kid protein but conserved the corregulatory potential of the wild-type protein. Further RNA cleavage assays done using mass spectrometry analysis on two different RNA substrates, 5'-AUACA-3' and 5'-UUACU-3', indicated that the mutations abolished or reduced drastically the RNase activity of the toxin without altering substantially its capacity to bind to the mimetic substrate, 5'-AdUACA-3'.

The model also proposed the existence of two possible and symmetric RNA binding sites on the dimeric structure of the active toxin and identified residues involved in general binding to the substrate, such as R85, or in specific interactions with the bases at the core sequence 5'-UAC-3' such as A55, T46 and T69. With the exceptions of T46G mutant, these mutants showed a reduced but measurable RNase activity. R85W showed a drastic reduction in RNA binding and has a concomitant reduction in RNase activity. Kid mutants retaining RNase activity, also showed the potential to inhibit protein synthesis *in vitro* and the toxicity of the Kid wt protein *in vivo*. While supporting the available model the results obtained reveal additional complexities on the role of T46.

The analysis of the possible involvement of interactions of Kid toxin with components of the ribosome machinery in the mechanism of protein synthesis inhibition was opened by the accidental discovery of novel mutations in *prfA*. This gene encodes the polypeptide releasing



## Summary

---

factor RF1 of *Escherichia coli*. The mutants were isolated using a positive genetic screen based on the *parD* (*kis*, *kid*) toxin-antitoxin system that allowed the direct selection of mutants with altered translational termination efficiency at UAG codons. The isolated *prfA* mutants displayed a ~10- fold decrease in UAG termination efficiency with no significant changes in RF1 stability *in vivo* and allowed the bypass of an amber mutation in the *Kis* antitoxin used in the positive genetic screen. All three mutations, G121S, G301S and R303H, were situated close to the nonsense codon recognition site in RF1-ribosome complexes and showed increased sensitivity to aminoglycoside antibiotics acting on this region as determined in cell growth assays. The *prfA* mutants displayed increased sensitivity to the RelE toxin encoded by the *relBE* system of *E. coli*, as determined in protein synthesis and cell growth assays. These results provided *in vivo* support for the functional interaction between RF1 and RelE previously determined by RNase assays *in vitro*. Surprisingly the *prfA* mutants also showed increased sensitivity to the *Kid* toxin as determined in similar protein synthesis and cell growth assays. This extra-sensitivity was restored to normal levels upon overproduction of the wild-type RF1 protein or the *Kis* antitoxin and required the RNase activity of the protein. This provided first evidence for the involvement of RF1 in the pathway of *Kid* toxicity and added a further complexity to the role of *Kid* as protein synthesis inhibitor.

### III. INTRODUCCIÓN



## 1 PLÁSMIDOS

### 1.1 Definición, sistemas de mantenimiento y de transferencia.

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos capaces de replicar autónoma y controladamente. Forman parte del genoma variable de los microorganismos al que pueden contribuir con distintas funciones favoreciendo así su adaptación versátil a distintos nichos ecológicos. Todos los plásmidos son moléculas de ADN de cadena doble de forma circular o lineal. Pueden diferir en sus replicones básicos que incluyen las funciones específicas requeridas para su replicación y para el control de este proceso. Además de estas funciones que constituyen el principal sistema de mantenimiento, los plásmidos pueden llevar sistemas auxiliares de mantenimiento (sistemas de partición, sistemas toxina-antitoxina, sistemas de decatenación de dímeros; **ver Introducción 1.2**) que en principio son dispensables e independientes de los sistemas de replicación y control. Los plásmidos que son capaces de establecerse autónomamente en especies y/o géneros diferentes, reciben el nombre de plásmidos de amplio espectro de huésped. Dicha capacidad está relacionada con sus sistemas de mantenimiento tanto esenciales como auxiliares (Thomas y Nielsen, 2005, del Solar y col., 1996).

Los plásmidos son elementos genéticos móviles que pueden transferirse de una bacteria donadora a otra receptora mediante procesos de conjugación o movilización. Estas transferencias están asociadas a un proceso de replicación que origina dos copias, una de las cuales permanece en la bacteria donadora y la otra se establece en la receptora. Los plásmidos conjugativos tienen toda la información genética para iniciar y completar el proceso conjugativo, mientras que los plásmidos movilizables aportan las funciones esenciales para iniciar el proceso de transferencia y utilizan la maquinaria adicional proporcionada por un plásmido conjugativo co-residente para completar el proceso de transferencia (Llosa y col., 2002, Garcillan-Barcia y col., 2009). En general, los plásmidos conjugativos son grandes y de bajo número de copias. Su capacidad de transferencia permite que células de una población que hayan perdido estos elementos genéticos puedan recuperarlos eficientemente de otras células portadoras presentes en la población. En consecuencia, estos sistemas contribuyen significativamente al mantenimiento de la información genética extracromosómica en las poblaciones bacterianas (Bennett, 2008).

El papel de los plásmidos en la adaptación de las bacterias a distintos nichos ecológicos está relacionado con su capacidad para complementar la información básica del genoma microbiano con nueva información. Esta información adicional puede determinar la resistencia a antibióticos o a metales pesados, la producción de toxinas y/o bactericinas, la capacidad para utilizar determinados metabolitos como fuente de energía o de detoxificar productos ambientales (Banerjee, 2004) y de esa manera favorecer la adaptación de su huésped frente a estrés ambiental. Desde un punto de vista clínico, los plásmidos han adquirido relevancia por su capacidad de transferir resistencias antibióticas o factores de virulencia a patógenos

humanos (Alanis, 2005, Hayes, 2003, Davison, 1999, Williams y Hergenrother, 2008). Desde un punto de vista biotecnológico, los plásmidos actúan como vehículos de genes en las poblaciones microbianas, lo cual, en combinación con su capacidad para ser introducidos en las células mediante transformación, ha sido ampliamente utilizado para desarrollar vectores especializados que permiten realizar construcciones que incorporen a la célula nuevas funciones de interés biológico o biotecnológico, y que, eventualmente, pueden facilitar el aislamiento de los productos correspondientes.

### 1.2 Sistemas de mantenimiento plasmídicos.

Existen al menos tres circunstancias que pueden favorecer la pérdida de un plásmido: i) Fluctuaciones en la eficiencia de replicación y en el acoplamiento de este proceso con el ciclo celular. ii) La distribución estadística de las copias en la división celular: si ocurre un reparto estadístico la pérdida del plásmido estaría correlacionada con el número de copias del mismo, siendo más alta para plásmidos de bajo número de copias. iii) La compartimentalización de las copias del plásmido: esta compartimentalización puede ocurrir como resultado de la formación de multímeros originados por recombinación homóloga; los multímeros reducen las copias que pueden distribuirse independientemente durante la división celular, favoreciendo la aparición de células sin plásmido.

Los plásmidos disponen de sistemas que aseguran su mantenimiento en la célula, compensando las distintas circunstancias desestabilizadoras:

i) Los sistemas de control de replicación, modulados por efectores negativos, acoplan la eficiencia de replicación de los plásmidos al ciclo celular, corrigiendo fluctuaciones en la frecuencia de inicio de replicación y manteniendo así un número de copias constante en la población; la combinación de los sistemas de replicación y control constituyen el principal sistema de mantenimiento plasmídico (Nordstrom, 2006).

ii) Los sistemas de partición activa posicionan el ADN plasmídico en la célula incrementando las posibilidades de que cada célula hija reciba al menos una copia del plásmido durante la división celular (Hiraga, 1992, Williams y Thomas, 1992, Funnell, 2005, Bouet y col., 2006, Schumacher, 2008). En consecuencia, estos sistemas neutralizan la inestabilidad asociada a una distribución estadística de las copias durante la división celular.

iii) Los sistemas de recombinación específica decatenan los multímeros originados por recombinación entre secuencias homólogas, evitando la compartimentalización asociada a este proceso (secuestro de múltiples copias en una molécula). En consecuencia disminuyen la aparición de células sin plásmido durante la división celular (Summers y Sherratt, 1984, Bouet y col., 2006, Blaby y Summers, 2009).

iv) Los sistemas toxina-antitoxina o sistemas T-A actúan eliminando o desfavoreciendo la proliferación de las células que han perdido el plásmido; por ello son también conocidos como sistemas de muerte condicional o de adicción plasmídica (Hayes, 2003). Estos sistemas, a

diferencia de los sistemas de partición, actúan a nivel postsegregacional favoreciendo de una manera indirecta el mantenimiento de plásmidos en la población.

## 2 SISTEMAS TOXINA-ANTITOXINA (T-A)

Los primeros sistemas T-A identificados fueron el sistema *ccd* del plásmido F (Hiraga y col., 1986), el sistema *hok-sok* de R1 (Gerdes y col., 1986) y el sistema *parD* (*kis-kid*) del plásmido R1 (Bravo y col., 1987). Estos sistemas auxiliares de estabilidad plasmídica se encontraron en plásmidos conjugativos de bajo número de copias. Los sistemas T-A están compuestos, generalmente, por dos genes organizados en un operón. El primer gen codifica una antitoxina inestable y el segundo una toxina estable, siendo frecuente el solapamiento de ambos *loci*. La diferente estabilidad de los dos componentes es la que permite la activación de la toxina en determinadas situaciones.

La toxina es siempre una proteína estable que inactiva procesos importantes para la proliferación o la viabilidad celular. Según la naturaleza de la antitoxina, los sistemas T-A se pueden clasificar en:

- Sistemas tipo I: el gen de la antitoxina codifica un ARN antisentido que es complementario a parte del ARNm de la toxina y que inhibe la traducción de ésta al unirse al mismo. El sistema más estudiado es el sistema *hok-sok* del plásmido R1 de *E. coli* (Gerdes y col., 1986). La toxina de estos sistemas suele ser una pequeña proteína hidrofóbica que ejerce su acción tóxica en las membranas de las bacterias al interaccionar con ellas (Fozo y col., 2008, Gerdes y Wagner, 2007).
- Sistemas tipo II: el gen de la antitoxina codifica para una proteína inestable que al unirse a la toxina neutraliza su toxicidad. Estos sistemas T-A han sido los más estudiados [Revisados recientemente (Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009)].

El presente trabajo se centra en el estudio de un sistema T-A tipo II. La **figura 1** muestra la organización genética y regulación típica de este tipo de sistemas T-A. Los genes de la toxina y la antitoxina forman un operón cuya regulación transcripcional se realiza a través de la acción concertada de las proteínas codificadas por el propio operón. La autorregulación se lleva a cabo por un complejo toxina-antitoxina que es capaz de unirse a la región operadora del sistema y actuar como represor transcripcional del mismo (de Feyter y col., 1989, Magnuson y Yarmolinsky, 1998, Monti y col., 2007, Overgaard y col., 2008). Dicho complejo puede ser o no igual al complejo T-A formado para la neutralización de la toxina. Pese a ser la regulación más extendida la modulada por la toxina y la antitoxina, puede ocurrir también que un tercer componente del sistema actúe como regulador transcripcional. Éste es el caso del sistema  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  del plásmido pSM19035 en el cual la proteína  $\omega$  actúa como regulador y no como toxina o antitoxina del sistema (de la Hoz y col., 2000).

La antitoxina es más inestable que la toxina debido a que es degradada eficientemente por proteasas celulares tipo Lon, ClpXP, o ClpAP (Jaffe y col., 1985, Gerdes y col., 1986, Tsuchimoto y col., 1992, Van Melderen y col., 1994, Lehnher y Yarmolinsky, 1995, Aizenman y col., 1996, Christensen y Gerdes, 2004). La no reposición de la antitoxina en las células que no han heredado el plásmido junto con su degradación proteolítica selectiva, permite la activación de la toxina que actúa eliminando o interfiriendo selectivamente con la proliferación de dichas células. Esta interferencia favorece indirectamente el mantenimiento del plásmido en las poblaciones bacterianas.

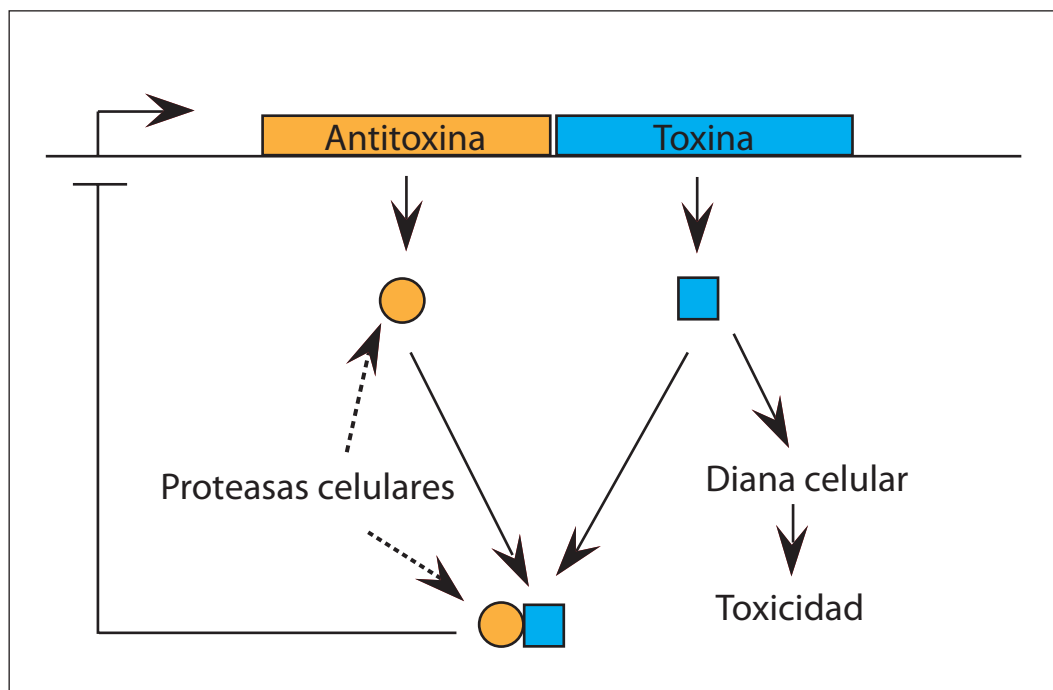


Figura 1.- Organización genética y funcional de los sistemas T-A tipo II. Se muestran los genes que codifican para la antitoxina (amarillo) y la toxina (azul). La unión de la antitoxina neutraliza la toxina que es incapaz de ejercer su acción sobre su diana celular. Aunque, en general, las antitoxinas son capaces de actuar como represores poco eficientes del promotor del sistema, la interacción toxina-antitoxina se requiere para una regulación transcripcional eficiente. La degradación selectiva de la antitoxina por proteasas celulares deja libre a la toxina para actuar sobre sus dianas. [Adaptado de (Gerdes, 2000)].

La presencia de estos sistema T-A está muy extendida tanto en plásmidos de Gram-negativas como en los de Gram-positivas, además de estar presentes en cromosomas de procariotas y arqueas (Anantharaman y Aravind, 2003, Gerdes y col., 2005, Sevin y Barloy-Hubler, 2007) formando así una parte significativa del llamado genoma flexible (Pandey, 2005). Análisis realizados para la búsqueda de estos sistemas a lo largo del genoma de diferentes microorganismos han revelado una alta diversidad de dichos sistemas y su presencia múltiple en los cromosomas bacterianos. En particular, se han identificado hasta la fecha en diferentes cepas de *E. coli*, once sistemas T-A: *relBE*, *chpA* (*mazEF*), *chpB*, *ccd*, *dinJ-yafQ*, *yefM-yoeB*, *higBA*, *hipBA*, *hicAB*, *parDE*, *yafNO* y *ygiT-mqsR* (*ygiU*). Otras especies bacterianas presentan un mayor número de sistemas T-A, como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, *Nitrosomas europaeae*,

*Sinorhizobium meliloti*, que poseen más de cincuenta posibles sistemas T-A; mientras que otras especies presentan pocos o ningún sistema, como *Rickettsia prowazeki*, *Campilobacter jejuni*, o *Mycobacterium leprae*. En un principio, se postuló que la presencia mayoritaria de estos sistemas T-A en bacterias de vida autónoma y su ausencia en endosimbiontes, indicaba que estos sistemas jugaban un papel importante en la respuesta al estrés, lo que facilitaría la adaptación a distintos nichos ecológicos. Así, *M. leprae*, patógeno intracelular obligado, no posee ningún sistema T-A, mientras que *M. tuberculosis*, evolutivamente relacionado con *M. leprae*, posee más de sesenta (Pandey, 2005). La obtención de nuevos datos provenientes de estudios comparativos de genomas bacterianos que buscaban nuevos sistemas T-A, no permiten confirmar esta hipótesis; no existen datos suficientes que prueben que esta distribución diferencial no se deba meramente al azar (Sevin y Barloy-Hubler, 2007, Makarova y col., 2009).

Por otra parte, dentro de una misma especie bacteriana existe también una gran diversidad de sistemas T-A. Así, la comparación de siete cepas de *E. coli* mostró que algunos sistemas T-A están frecuentemente representados (CcdB, MazF, y HipA), mientras que otros están ausentes o poco representados (Doc, Vap, RelE y ParE) (Van Melderén y Saavedra De Bast, 2009). Este patrón sugiere que los sistemas T-A más frecuentemente representados fueron adquiridos mediante transferencia genética horizontal, e integrados en el cromosoma bacteriano con anterioridad a los menos representados. La relevancia de la transferencia horizontal en la adquisición cromosómica de dichos sistemas está también apoyada por su presencia en profagos crípticos o en islas genómicas (Wilbaux y col., 2007).

## 2.1 Familias de sistemas T-A.

Los diferentes sistemas toxina-antitoxina se han clasificado en nueve familias según la homología de la secuencia de aminoácidos de sus toxinas. La **tabla 1** muestra las dianas y los procesos celulares sobre los que actúan.

Tabla 1.- Familias de sistemas toxina-antitoxina en base a su secuencia de aminoácidos. [Adaptado de (Van Melderén y Saavedra De Bast, 2009)].

<i>Sistema T-A</i>	<i>Diana toxina</i>	<i>Actividad toxina</i>	<i>Proceso celular</i>
<i>ccdAB</i>	ADN girasa	Inhibe actividad de la girasa	Replicación del ADN
<i>relBE</i>	ARNm	Corta el ARNm en el sitio A del ribosoma (Pedersen y col., 2003)	Traducción
<i>chpAK (mazEF)</i>	ARN	Endoribonucleasa (Munoz-Gomez y col., 2004, Zhang y col., 2003)	Traducción



<i>parDE</i>	ADN girasa	Inhibe actividad de la girasa, produce cortes en ADN de doble hebra (Jiang y col., 2002)	Replicación
<i>phd-doc</i>	Ribosoma traduciendo	Induce cortes en el ARNm al activar RelE (Garcia-Pino y col., 2008), se une a subunidad ribosomal 30S (Liu y col., 2008)	Traducción
<i>vapBC</i>	ARN	Endoribonucleasa (Daines y col., 2007)	Traducción (Winther y Gerdes, 2009)
$\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$	Indeterminada	Fosfotransferasa (Meinhart y col., 2001)	Indeterminado (Lioy y col., 2006)
<i>hipBA</i>	EF-Tu (Schumacher y col., 2009)	Proteín-Quinasa (Correia y col., 2006)	Traducción
<i>higBA</i>	ARNm	Corta ARNm (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2006)	Traducción (Budde y col., 2007)

Otra posible clasificación basada en los dominios estructurales de las toxinas propone cinco familias. La primera familia es la de las toxinas que poseen dominios ribonucleasa/girasa como las toxinas ChpAK (MazF) o CcdB; otra familia está formada por toxinas con dominios serina/treonina quinasa como la toxina HipA; la familia de toxinas con dominios ribonucleasa barnasa similares a la ribonucleasa  $\alpha$ -sarcina está compuesta por toxinas como RelE, YafQ o YoeB. Otra familia de toxinas posee dominios tipo adenilato quinasa, este es el caso de la toxina  $\zeta$  del sistema  $\omega$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ . Por último, existen toxinas con dominios estructurales tipo PIN (Pilt N Terminus), presentes en otras proteínas con función ribonucleasa como el exosoma eucariota (Schaeffer y col., 2009), este es el caso de toxinas como VapC.

## 2.2 Sistemas T-A cromosómicos.

Las clasificaciones anteriores incluyen sistemas T-A que están presentes tanto en plásmidos como en cromosomas bacterianos. Anteriormente se ha mencionado el papel fundamental que tienen estos sistemas en el mantenimiento de plásmidos pues eliminan o interfieren en la proliferación de células que han perdido dicho plásmido. Además, se conoce que pueden incrementar el *fitness* de plásmidos transmitidos horizontalmente cuando compiten con plásmidos que carecen de estos sistemas T-A al eliminar a la progenie que no los herede (Cooper y Heinemann, 2000).

Sin embargo, existen diversas teorías sobre la funcionalidad de los sistemas T-A integrados en el cromosoma bacteriano. Una posibilidad es que actúen evitando delecciones a gran escala de las regiones genómicas dispensables en las que se encuentran, modulando así

la evolución dinámica del genoma (Rowe-Magnus y col., 2003). El hecho de que los sistemas T-A impidan su eliminación y la de genes adyacentes subraya el carácter de los sistemas T-A como operones egoístas (Buts y col., 2005). Este fenómeno se pone de manifiesto en el caso de los superintegrones de *Vibrio cholerae* [revisados por (Mazel, 2006)], que son fragmentos de ADN móviles capaces de moverse de un lugar a otro en el cromosoma y que pueden poseer genes dispensables pero necesarios en determinadas condiciones. Los sistemas T-A podrían estar ayudando a estabilizar estos superintegrones al contraseleccionar a las células que los pierden [revisión (Van Melderen y Saavedra De Bast, 2009)]. Esta función se ha probado para otros elementos genéticos móviles, y también en profagos crípticos, como es el caso de *relBE* del profago Qin (Gottfredsen y Gerdes, 1998). No obstante, no ha sido probada su participación para evitar deleciones cromosómicas en *E. coli* en el caso de *dinJ-yafQ*, o para estabilizar plásmidos inestables, *ccd*<sub>0157</sub>. Luego el grado de eficiencia como estabilizadores de sí mismos y de regiones genéticas adyacentes depende del sistema en particular y del contexto (Wilbaux y col., 2007, Rowe-Magnus y col., 2003).

En casos particulares en los que existe suficiente homología para que ocurran interacciones neutralizadoras cruzadas entre toxinas y antitoxinas de sistemas plasmídicos y cromosómicos, los sistemas T-A cromosómicos pueden actuar como módulos anti-adicción de sistemas T-A plasmídicos. En este caso, las antitoxinas cromosómicas evitarían la muerte postsegregacional al perder un plásmido con un sistema T-A homólogo. Este hecho se ha estudiado con el sistema *ccd*<sub>Ech</sub> de *Erwinia chrysanthemi* 3937 y el sistema *ccd* del plásmido F de *E. coli* (Saavedra De Bast y col., 2008). La pérdida de la actividad anti-adictiva podría hacer desaparecer a dichos sistemas (Wilbaux y col., 2007, Mine y col., 2009).

Otra hipótesis propone que los sistemas T-A son programas de muerte celular programada bacteriana que se inducen en condiciones de estrés en parte de la población bacteriana y que redundan en beneficio del resto de las células (muerte altruista). La inducción en la población ocurriría en respuesta a un factor tipo *quorum sensing*. Se ha visto que el sistema *chpA* (*mazEF*) produce la muerte celular en una población bacteriana bajo distintas condiciones de estrés (ayuno de aminoácidos, antibióticos, choque oxidativo o altas temperaturas) (Engelberg-Kulka y col., 2006). En dicho sistema se ha identificado un pequeño péptido que se ha denominado factor de muerte extracelular o EDF, que se sintetiza en condiciones de estrés nutricional y que actúa como un factor similar a los que participan en el fenómeno de *quorum sensing*, permitiendo la comunicación en la población y la activación de la toxina (Kolodkin-Gal y col., 2007). Sin embargo, esta propuesta permanece pendiente de una validación independiente (Gerdes, 2000).

Otra teoría más ampliamente aceptada es la que propone que la activación de estos sistemas T-A induce un crecimiento estático pero reversible que permite que las células dejen de crecer en situaciones adversas y que recuperen su capacidad de proliferar cuando esta situación de estrés desaparece (Christensen y Gerdes, 2003, Pedersen y col., 2002). Aunque

recientemente se ha visto que la inhibición del crecimiento es independiente de cinco de los diez sistemas T-A de *E. coli* hallados hasta la fecha (Tsilibaris y col., 2007), existen otros cinco sistemas T-A encontrados en *E. coli* que pueden ser los responsables de la acción bacteriostática.

Otro punto de vista propone que los sistemas T-A cromosómicos están relacionados con el fenómeno de persistencia. La persistencia se debe a que una pequeña fracción de las células ( $10^{-6}$ ) del cultivo entra en un estado de crecimiento atenuado que permite que las células sean resistentes a condiciones de estrés y, sobre todo, a un gran número de antibióticos (Lewis, 2005). El sistema T-A *hipBA* parece estar relacionado con este fenómeno de persistencia (Keren y col., 2004) puesto que mutaciones en la toxina (HipA) que mantienen su funcionalidad e interfieren con la neutralización de la antitoxina aumentan la frecuencia de persistentes (Korch y col., 2003).

Un último modelo propone la participación de sistemas T-A en el desarrollo celular. Esta propuesta se basa en estudios de la formación del cuerpo fructífero en *Myxococcus xanthus*. Dichos estudios identificaron a una toxina cromosómica homóloga a ChpAK (MazF) cuya expresión y activación está controlada por el regulador global de diferenciación MrpC. La toxina, que carece de la antitoxina homóloga a MazE, está regulada por MrpC que favorece su activación en situaciones que inducen la diferenciación y la formación del cuerpo fructífero (Nariya y Inouye, 2008); la muerte celular asociada a esta activación favorece el proceso de diferenciación. Dicha muerte celular es necesaria para la producción del cuerpo fructífero, ya que sin MazF-mx ocurre una disminución severa de su formación. Este es un caso en el que el sistema T-A se ha integrado en las redes de regulación de la bacteria.

### 2.3 Sistemas T-A implicados en el proceso de traducción.

En el apartado siguiente se presentan datos sobre diferentes sistemas T-A cuyas toxinas actúan en algún nivel del proceso de síntesis de proteínas, ya que el presente trabajo versa sobre la toxina Kid del sistema T-A *parD* del plásmido R1 que es una ARNasa y un inhibidor de síntesis de proteínas (Munoz-Gomez y col., 2005, Zhang y col., 2004).

#### 2.3.1 SISTEMA *hipBA* DEL CROMOSOMA DE *E. coli*

El sistema T-A *hipBA*, que está involucrado en el fenómeno de persistencia, fue descrito por primera vez en 1944 por Joseph Bigger en células de *Staphylococcus sp.* tratadas con penicilina (Bigger, 1944). Las células persistentes no son células mutantes, sino variantes fenotípicas de las células silvestres que tras la reinoculación producen un cultivo con la misma cantidad de células persistentes (Bigger, 1944, Keren y col., 2004). Las células persistentes no se producen en una etapa particular del crecimiento, ni tampoco como respuesta a un tratamiento antibiótico, sino que son células preexistentes en el cultivo (Keren y col., 2004, Moyed y Bertrand, 1983, Balaban y col., 2004). Se encontró que el alelo *hipA7* incrementaba 1000 veces la fracción de persistentes al tratamiento de ampicilina en comparación a células silvestres, y también como

respuesta a otras situaciones de estrés como son daño en el ADN, temperaturas extremas o tratamiento con flouoroquinolonas (Moyed y Bertrand, 1983, Wolfson y col., 1990, Scherrer y Moyed, 1988). El alelo *hipA7* tiene dos mutaciones, G22S y D291A, siendo la última de ellas la necesaria para que ocurra el fenómeno de aumento de persistencia (Korch y col., 2003). Además, *hipA7* facilita el desarrollo del estado de persistencia a través de la inducción de la alarmona ppGpp (Korch y col., 2003).

La toxina HipA pertenece al sistema T-A cromosómico de *E. coli* *hipBA*, que tiene un sistema homólogo en el plásmido simbiote de *Rhizobium* sp. donde actúa como sistema estabilizador del plásmido (Falla y Chopra, 1999). La antitoxina HipB es un represor transcripcional del operón *hipBA*. Es una proteína de tipo Cro/CI de unión a ADN (Black y col., 1994), que forma un complejo con HipA (Black y col., 1991). HipA actúa como toxina del sistema pues, en ausencia de HipB, inhibe el crecimiento celular, mientras que HipB neutraliza este efecto comportándose como la antitoxina del sistema (Gerdes y col., 2005, Buts y col., 2005).

Se conoce que HipA posee actividad serin-quinasa y que es capaz de autofosforilarse. Esta actividad quinasa y la autofosforilación son necesarias para activar su capacidad de inhibir el crecimiento celular y para aumentar la producción de persistentes (Correia y col., 2006). Tras resolver la estructura de HipA, se confirmó que esta proteína posee homología estructural con la quinasa CDDK2/ciclina humana (Schumacher y col., 2009). HipA se une y fosforila al factor de elongación de la traducción EF-Tu, que pertenece a la superfamilia guanosina trifosfato y que actúa en la elongación de la traducción al catalizar la unión del ARNt al ribosoma (Nyborg y Liljas, 1998). La fosforilación de EF-Tu por HipA bloquea la unión del ARNt al EF-Tu e inactiva la traducción (Lippmann y col., 1993, Alexander y col., 1995).

La resolución de la estructura del complejo HipA-HipB-ADN puso de manifiesto que la unión de HipB a HipA previene el cambio conformacional que HipA sufre al unirse a su sustrato, siendo dicho cambio necesario para que el sitio activo de HipA quede situado correctamente para fosforilar al sustrato. Con la estructura del complejo HipA-HipB-ADN resuelta se determinó que el fenotipo de *hipA7* puede deberse a una interferencia con la interacción HipA-HipB que liberará la actividad quinasa de HipA, ya que el residuo D291 establece contactos que estabilizan el complejo neutralizador (Schumacher y col., 2009).

Además de HipA, otros sistemas T-A pueden participar en el fenómeno de persistencia, ya que la sobreexpresión de otras toxinas, como RelE y MazF, también causan un incremento de la formación de persistentes y de la tolerancia a fármacos (Keren y col., 2004).

### 2.3.2 SISTEMA *phd-doc* DEL PROFAGO P1

El plásmido-profago P1 de *E. coli* codifica un sistema T-A, *phd-doc*, que confiere estabilidad al mismo eliminando segregantes. Phd (*prevent host death*) es la antitoxina que neutraliza a la toxina Doc (*death on curing*) (Lehnherr y col., 1993). Los genes que codifican Doc y

Phd están localizados en un operón autorregulado (Magnuson y col., 1996). La antitoxina tiene 73 aminoácidos (8,1 kDa) y la toxina 126 aminoácidos (13,6 kDa). El complejo heterotrimérico Phd<sub>2</sub>Doc es el encargado de neutralizar la actividad de Doc y de autorregular la transcripción del sistema (Gazit y Sauer, 1999, Magnuson y Yarmolinsky, 1998). El dímero de Phd es capaz de autorregular el módulo de una manera menos eficiente que el complejo T-A (McKinley y Magnuson, 2005, Smith y Magnuson, 2004). La antitoxina en su forma dimérica, Phd<sub>2</sub>, está sujeta a la actividad proteasa de ClpXP (Lehnher y Yarmolinsky, 1995).

Estudios previos muestran que la acción de Doc en la muerte postsegregacional requiere la presencia del sistema *chpA* (*mazEF*), por lo que se apuntó a un acoplamiento de ambos sistemas T-A (Hazan y col., 2001). Además, se ha demostrado que Doc induce la actividad ARNasa de la toxina RelE, produciéndose cortes en el ARNm mediados por esta última toxina (García-Pino y col., 2008). Posteriormente, se ha mostrado que la acción de la toxina Doc ocurre durante el proceso de elongación de la traducción, bloqueándolo pero sin actuar como una ARNasa; este bloqueo inhibe la síntesis de proteínas y lo hace estabilizando el ARNm y promoviendo la acumulación de ribosomas. Doc se une a la subunidad 30S de los ribosomas en un lugar que solapa con el de la unión del antibiótico higromicina B (HygB), compitiendo con su unión. Dado que HygB previene el movimiento del peptidil-ARNt del sitio A al sitio P del ribosoma, se postula que la unión de Doc podría estar ejerciendo el mismo efecto inhibitor en el proceso de elongación de la traducción (Liu y col., 2008). El bloqueo de la elongación, en el paso de translocación, explica la acumulación de los ribosomas que quedan parados sobre los ARNm que están siendo traducidos y la estabilización de estos últimos.

### 2.3.3 SISTEMA *relBE* DEL CROMOSOMA DE *E. coli*

El sistema *relBE* de *E. coli* está compuesto por la antitoxina RelB y la toxina RelE, organizadas en un operón típico de sistemas T-A de tipo II (Gottfredsen y Gerdes, 1998). El gen *relB* se identificó en mutantes de *E. coli* que mostraban un fenotipo relajado tardío. Estos mutantes iniciaban una respuesta tras el ayuno de aminoácidos similar a la de las células silvestres, produciendo altos niveles de ppGpp que apagaban la síntesis de ARNm estables. Eventualmente, la disminución de ARNt no cargados reduce los niveles de ppGpp, lo que permite que se inicie la síntesis de ARN en una respuesta relajada. Sin embargo, en las cepas mutantes el fenotipo relajado, después de la bajada del ppGpp, ocurre 10 minutos más tarde que en la cepa silvestre (Lavalle, 1965, Diderichsen y col., 1977, Mosteller, 1978).

Se han encontrado más de 400 *loci* homólogos a este sistema T-A en aproximadamente 200 genomas procariotas (Gerdes y col., 2005, Gerdes, 2000, Anantharaman y Aravind, 2003). Las comparaciones de homología de secuencia y/o estructura han revelado que la superfamilia RelE está compuesta por miembros de las familias de HigB, YoeB, YafQ y YhaV (Budde y col., 2007, Motiejunaite y col., 2007, Schmidt y col., 2007, Kamada y Hanaoka, 2005).



La toxina RelE y la antitoxina RelB forman un complejo no tóxico (Galvani y col., 2001) que junto con la antitoxina libre es capaz de regular la transcripción del operón *relBE* (Gotfredsen y Gerdes, 1998, Li y col., 2008). En condiciones normales, RelB se sintetiza en exceso con respecto a la toxina RelE (Gotfredsen y Gerdes, 1998). Según el grupo de Kenn Gerdes, el complejo heterotrimérico, RelB<sub>2</sub>RelE, que se forma en dichas condiciones es el encargado de la represión del sistema (Overgaard y col., 2008). En cambio, el grupo de Masanori Inouye propone que la forma octamérica RelE<sub>2</sub>-RelB<sub>2</sub>-RelE<sub>2</sub>-RelB<sub>2</sub> es el represor más eficiente del operón y en menor medida el tetrámero RelB<sub>4</sub> (Li y col., 2008).

El sistema *relBE* actúa como respuesta al ayuno de aminoácidos (Christensen y col., 2001), ya que cuando se entra en una condición de ayuno nutricional se incrementa la transcripción de operón *relBE*, a la vez que se reduce el nivel de antitoxina al activarse su proteólisis mediada por la proteasa Lon (Gronlund y Gerdes, 1999). La liberación de la toxina RelE conlleva una parada del crecimiento que, en determinadas condiciones puede causar la muerte celular (Christensen y Gerdes, 2003).

RelE es activa en eucariotas pues se conoce que induce la muerte celular en levaduras y células humanas (Kristoffersen y col., 2000, Yamamoto y col., 2002). Además, inhibe la traducción *in vivo* en *E. coli* (Christensen y col., 2001). La toxina RelE se une a los ribosomas y RelB impide esta unión tal y como se demostró mediante ensayos de co-sedimentación con los ribosomas (Galvani y col., 2001). La inhibición de la síntesis de proteínas está mediada por roturas en los ARNm unidos al ribosoma. Los cortes se producen entre la segunda y tercera bases del codón que esté situado en el sitio A del ribosoma (Christensen y Gerdes, 2003), aunque la toxina actúa con preferencia induciendo cortes en el codón de terminación UAG (Pedersen y col., 2003). No obstante, se pueden encontrar cortes en ARNm en el sitio E en ausencia de ARNt y, también, en ARNm situados en subunidades ribosomales 30S libres (Pedersen y col., 2003). RelE comparte con el factor de terminación de traducción RF1 su preferencia por codones UAG. De hecho, el corte mediado por RelE *in vitro* es competido por RF1, o por la unión de ARNt o por la elongación de péptidos (Pedersen y col., 2003). Se ha sugerido que RelE podría estimular la actividad ARNasa del ribosoma con una especificidad de codones (Hayes y Sauer, 2003), ya que RelE parece carecer de residuos que puedan llevar a cabo reacciones de catálisis (Kamada y Hanaoka, 2005). También se ha observado que RelE es capaz de inducir cortes en los ARNm *in vivo* (Christensen y Gerdes, 2003). Los ARNm se unen al sitio A del ribosoma bloqueado y cargan un aminoácido alanina en el polipéptido naciente. El ARNm bloqueado se libera siendo degradado por ARNasas celulares. Posteriormente, se continúa la síntesis del polipéptido naciente sobre el mensaje de ARNm cuya traducción añade una región C-terminal que marca el polipéptido final para ser degradado por el proteosoma. La sobreproducción de ARNm contrarresta la inhibición de la traducción mediada por RelE y estimula la recuperación por la antitoxina RelB (Christensen y Gerdes, 2003).

La estructura del complejo RelBE de la arquea *Pyrococcus horikoshii* OT3 reveló que la proteína RelE posee unas dimensiones generales y una forma similar al dominio IV de decodificación del factor de elongación EF-G, lo que indicaría que puede acceder al sitio A del ribosoma de manera similar a como lo hace el factor EF-G. La **figura 2** muestra la estructura de RelE donde se localizan posibles residuos implicados en su actividad (Takagi y col., 2005).

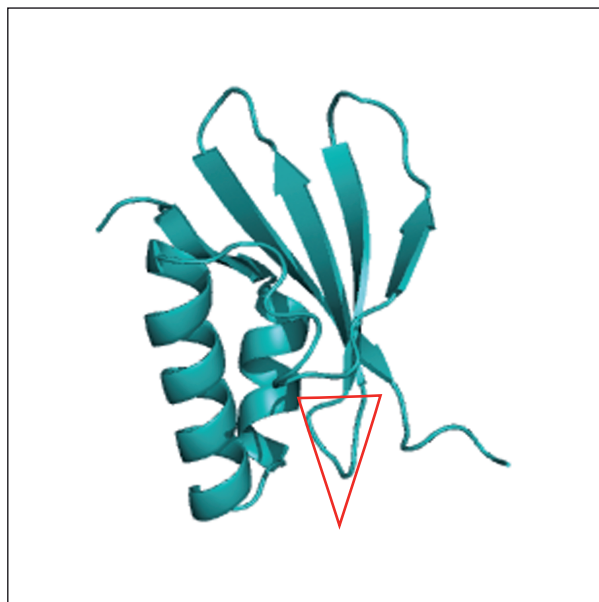


Figura 2.- Estructura de la toxina RelE de la arquea *Pyrococcus horikoshii* OT3. La estructura resuelta fue el complejo RelE<sub>2</sub>-RelB<sub>2</sub>, aquí se muestra un monómero de la proteína RelE. El triángulo rojo indica la parte de la proteína que contiene residuos requeridos para su actividad.

Además de su implicación en la respuesta al ayuno nutricional se ha visto que la sobreexpresión de la toxina conduce a un aumento del fenómeno de persistencia, lo que apoya que módulos T-A pueden ser efectores de dicho fenómeno (Keren y col., 2004).

### 2.3.4 SISTEMA *yefM-yoeB* DEL CROMOSOMA DE *E. coli*

El sistema *yefM-yoeB* está compuesto por la toxina YoeB y la antitoxina YefM cada una de las cuales posee un tamaño aproximado a 10 kDa. La inducción de la expresión de *yoeB* produce inhibición del crecimiento celular que es neutralizada por la inducción de la expresión de *yefM* (Grady y Hayes, 2003). La antitoxina YefM es inestable *in vivo* y se definió como una proteína altamente desestructurada que es sustrato de la proteasa Lon (Cherny y Gazit, 2004, Christensen y col., 2004). La toxina YoeB es estable y forma un complejo también estable con la antitoxina YefM (Cherny y col., 2005).

La actividad toxica de YoeB y su reversibilidad por YefM sugiere que, como en el caso de la toxina RelE, esté actuando sobre el ARNm durante el proceso de traducción (Christensen y col., 2004). Además, YoeB juega un papel específico en la letalidad asociada a la sobreproducción de la proteasa Lon, proceso en el cual no participan otros sistemas T-A como

*relBE*, *chpA* (*mazEF*), *dinJ-yafQ* (Christensen y col., 2004).

La estructura cristalográfica del complejo de YoeB con YefM puso de manifiesto homologías estructurales con RelE y YafQ. Las tres toxinas poseen de forma similar una superficie dorsal con residuos hidrofóbicos expuestos, que apunta a su posible participación como región de interacción con otros factores como tales como el ribosoma (Kamada y Hanaoka, 2005).

Se ha comprobado que YoeB corta ARNm *in vivo* cuando éstos se están traduciendo y que este corte ocurre en regiones situadas en el marco de lectura del ribosoma, sobre todo en codones de terminación, de forma muy similar a lo como ocurre con la toxina RelE (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2008). Sin embargo, a diferencia de RelE, esta toxina es capaz de cortar ARN “desnudo”, es decir, en ausencia de ribosomas, en regiones que contengan purinas, aunque sin gran especificidad de secuencia (Kamada y Hanaoka, 2005). Dado que *in vivo* no se encuentran cortes en el ARN con esta inespecificidad, se cree que YoeB tiene alta afinidad por sustratos de ARN que estén situados en el sitio A del ribosoma. Así, pocas moléculas de YoeB serán necesarias para inhibir la traducción y dichas moléculas estarán tituladas por su unión al ribosoma, siendo nula o muy poco eficiente su actividad sobre ARNs celulares libres de ribosomas (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2008).

El grupo de Masanori Inouye ha propuesto recientemente un mecanismo diferente de inhibición de la síntesis de proteínas mediado por esta toxina (Zhang y Inouye, 2009). Estos autores proponen que YoeB se une a la subunidad 50S del ribosoma 70S interaccionando con el sitio A. Esta interacción previene la formación del complejo de iniciación y, por tanto, inhibe el proceso de traducción rápidamente. Dicha inhibición provoca la activación de la actividad endoribonucleasa de los ribosomas o de YoeB, provocando el corte del ARNm en el sitio A y la liberación del extremo 3' del ARNm situado en el ribosoma.

Recientemente se ha demostrado que existe comunicación entre este sistema T-A y la toxina VapC. La inducción de la expresión de *vapC* produce cortes en el ARNm en los codones de terminación de un modo dependiente de la acción de YoeB. La activación de YoeB es, a su vez, dependiente de la proteasa Lon que promueve la degradación selectiva de la antitoxina YefM (Winther y Gerdes, 2009).

### 2.3.5 SISTEMA *dinJ-yafQ* DEL CROMOSOMA DE *E. coli*

El sistema T-A *dinJ-yafQ* codifica una toxina, YafQ, y una antitoxina, DinJ, que se agrupan dentro de la superfamilia de *relBE* (Gerdes y col., 2005), pese a presentar este sistema poca similitud de secuencia con los componentes de dicha superfamilia (Motiejunaite y col., 2007). El modelado molecular de la proteína YafQ muestra similitud estructural a otras ARNasas como son T1, barnasa, RelE o YoeB, lo que sugiere una actividad similar (Motiejunaite y col., 2007).



La sobreproducción de la toxina YafQ inhibe el crecimiento celular de *E. coli*, mientras que la antitoxina, al formar un complejo neutralizador con la toxina, contrarresta este efecto. Además de inhibir el crecimiento, la toxina es capaz de inhibir la síntesis de proteínas. La antitoxina DinJ parece ser susceptible a la degradación mediada por las proteasas Lon y Clp (Motiejunaite y col., 2007).

La toxina YafQ, en ausencia de DinJ, interacciona con ribosomas 70S o con la subunidad 50S, tal y como ha sido verificado por análisis de perfiles ribosomales. YafQ puede cortar ARNs en ausencia del proceso de traducción, no existiendo una gran especificidad de secuencia pues sólo se encuentra el dinucleótido 5'-GG-3' en cualquier lado de la secuencia de corte. En cambio, YafQ induce el corte del ARNm en la secuencia 5'-AAA-G/A-3' cuando se acopla al proceso de traducción, requiriendo que AAA (lisina) esté en el marco de lectura del ribosoma. La eficiencia de este corte debe ser muy alta, ya que no se detectan cortes más allá del nucleótido 60 en los ARNm y, además, los niveles de ARNm de la célula decaen muy rápidamente (Prysak y col., 2009).

El operón *dinJ-yafQ* contiene una secuencia de ADN similar a la secuencia de unión de la proteína LexA implicada en la respuesta SOS celular. Estudios previos mediante ensayos de retardo en gel (EMSA) y de *Northern blot* no pudieron demostrar que existiera una regulación del operón *dinJ-yafQ* mediada por la proteína LexA (Fernandez De Henestrosa y col., 2000). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el complejo DinJ-YafQ(His)<sub>6</sub> se une a la región del operador y que LexA(His)<sub>6</sub> también es capaz de hacerlo, pudiendo ocurrir una competición entre ambos por la regulación del sistema. El papel de YafQ en la respuesta SOS no está claro aún, YafQ puede estar implicada en facilitar la parada del crecimiento necesaria para reparar el ADN; sin embargo no se observan diferencias en la respuesta en una cepa  $\Delta$ *dinJ-yafQ* respecto a la cepa silvestre tras un tratamiento con UV o mitomicina C que activan la respuesta SOS. No obstante, en esta respuesta SOS pueden estar implicados otros sistemas TA como el sistema *yafNO* (Prysak y col., 2009).

Recientemente se ha mostrado que YafQ puede estar implicada en el fenómeno de tolerancia a fármacos específicos en *E. coli* creciendo en biopelículas. La producción de YafQ disminuye la muerte celular de las bacterias en estas condiciones cuando éstas se exponen a determinados antibióticos, aunque su expresión no tiene efectos en la resistencia o la tolerancia a antibióticos en células con crecimiento planctónico (Harrison y col., 2009).

### 2.3.6 SISTEMA *chpA* (*mazEF*) DEL CROMOSOMA DE *E. coli*

El sistema *chpA* (*mazEF*), junto con *chpB*, fue el primer sistema T-A que se identificó en el cromosoma de *E. coli* (Masuda y col., 1993). Tanto la toxina ChpAK como la antitoxina ChpAI presentan alta similitud de secuencia con las toxinas y antitoxinas de los sistemas *chpB* (ChpAI, ChpAK) y *parD* (Kid, Kis). La antitoxina ChpAI es degradada por la proteasa ClpAP durante la fase estacionaria (Hazan y col., 2001), y por Lon en condiciones de ayuno de

aminoácidos (Christensen y col., 2003).

Las antitoxinas ChpAI (MazE) y ChpBI son capaces de neutralizar la actividad tóxica de Kid, lo que podría indicar una conservación de función a parte de la homología de secuencia (Santos-Sierra y col., 1997, Santos-Sierra y col., 1998). Además de esta homología de secuencia, las estructuras cristalográficas de las toxinas de la familia de *mazEF* muestran gran homología (Hargreaves y col., 2002b, Kamada y col., 2003, Gogos y col., 2003). Sorprendentemente, estudios de interacción toxina-antitoxina por RMN indican que las interacciones asociadas a la neutralización de Kid por la antitoxina ChpAI (MazE) y por la antitoxina Kis son muy diferentes (Kamphuis y col., 2007).

ChpAK induce la inhibición de la síntesis de proteínas y, en menor medida, de la replicación, provocando un estado bacteriostático en *E. coli* que es reversible por la presencia de la antitoxina ChpAI (Pedersen y col., 2002).

ChpAK (MazF) es una endoribonucleasa que produce cortes en ARNs en ausencia de ribosomas (Zhang y col., 2003, Munoz-Gomez y col., 2004). Las secuencias de corte encontradas en estos grupos son 5'-NCA-3', preferentemente pero no exclusivamente, en regiones de cadena sencilla (Munoz-Gomez y col., 2004), y 5'-ACA-3' localizada en regiones de cadena sencilla (Zhang y col., 2003). Las dianas en doble cadena pueden ser expuestas por la acción de los ribosomas durante el proceso de traducción que desharían interacciones intramoleculares (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2008). Estas dianas pueden también exponerse a un corte eficiente *in vitro* con la ayuda de la proteína CspA, que previene la formación de estructuras secundarias en el ARN (Jiang y col., 1997) y que por lo tanto, estimula el corte de dianas en estructura secundaria tal y como se ha demostrado en el análisis de dos proteínas homólogas a ChpAK (MazF) de *Mycobacterium tuberculosis* (Zhu y col., 2008).

A diferencia de RelE, que "envenena" la maquinaria de síntesis de proteínas, la inducción de ChpAK inactiva mensajeros libres y mantiene el potencial de síntesis de proteínas en la célula al no actuar sobre ARNr (Baik y col., 2009). Este potencial se ha utilizado para promover la síntesis preferencial de una determinada proteína en la célula. La estrategia utilizada consistió en eliminar las secuencias de corte para ChpAK en el mensajero seleccionado y sobre-expresar esta toxina en la célula; debido a su especificidad por sitios de corte presentes con frecuencia en el ARNm, la toxina elimina estos mensajeros dejando principalmente disponible para la traducción el ARNm modificado (Suzuki y col., 2005).

El ayuno de aminoácidos produce un aumento de la transcripción del operón *chpA*, dependiente de la inducción de la proteasa Lon. Además, ChpAK produce cortes en ARNm que se están traduciendo y que son contrarestados por la acción de ARNtm (Christensen y col., 2003).

Este sistema T-A ha sido estudiado por el grupo de Hanna Engelberg-Kulka, el cual ha propuesto la hipótesis de la participación de sistemas T-A en la muerte celular programada bacteriana en respuesta a múltiples situaciones de estrés tales como: antibióticos que inhiben

la replicación o la traducción, el ayuno extremo de aminoácidos, la presencia de agentes o situaciones que producen daño del ADN como antibióticos o mitomicina C, o el ayuno de timina (Sat y col., 2001, Aizenman y col., 1996, Engelberg-Kulka y Glaser, 1999, Sat y col., 2003). Este grupo propone que dichas condiciones interfieren con la antitoxina y activan a la toxina produciendo la muerte celular. La muerte celular inducida por ChpAK se produce con preferencia, pero no exclusivamente, en fase exponencial (Hazan y col., 2004, Kolodkin-Gal y Engelberg-Kulka, 2009). La muerte celular es un fenómeno poblacional mediado por un factor extracelular llamado factor extracelular de muerte (EDF), que es un pentapéptido, NNWNN, que actúa de modo similar a las señales efectoras que intervienen en el mecanismo de *quorum sensing* (Kolodkin-Gal y col., 2007).

### 2.3.7 SISTEMA *parD* (*kis-kid*) DEL PLÁSMIDO R1 DE *E. coli*

El operon *parD* del plásmido R1 está compuesto por los genes *kid* y *kis*, que codifican respectivamente la toxina Kid (*killing determinant*) de 11,8 kDa y la antitoxina Kis (*killing supresor*) de 9,3 kDa. El sistema se identificó por azar al aislar un mutante en la antitoxina que desreprimía el sistema y aumentaba más de 1000 veces la estabilidad del plásmido sin cambiar sustancialmente su número de copias (Bravo y col., 1987, Bravo y col., 1988).

Posteriormente, se descubrió un sistema idéntico a *parD* en el plásmido R100 que se llamó *pemIK*, siendo PemK, la toxina y PemI, la antitoxina (Tsuchimoto y col., 1988). Estudios en mutantes *lon* indican que la proteasa Lon está implicada en la inactivación de la antitoxina, permitiendo que la toxina inhiba el crecimiento celular en situaciones en la que los niveles de antitoxina no se reponen (Tsuchimoto y col., 1992).

El sistema *parD* o *kid-kis* está regulado tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. La regulación postranscripcional está asociada a una degradación selectiva del extremo 3' del ARNm de *kis-kid*, que aumenta la dosis transcripcional de la antitoxina *kis*. Esto favorece que existan mayores niveles de antitoxina Kis que de toxina. También existe un acoplamiento traduccional de la toxina a la antitoxina que desfavorece la síntesis de la toxina Kid en ausencia de síntesis de la antitoxina Kis y que, junto con la degradación selectiva del mensajero policistrónico y la actividad de la proteasa Lon sobre la antitoxina, modula los niveles relativos de ambas proteínas (Ruiz-Echevarria y col., 1995a).

El sistema *parD* (*kid-kis*) está también regulado a nivel transcripcional. En esta regulación participan complejos toxina-antitoxina que interaccionan con la región promotora operadora. Mediante espectrometría de masas nativa se ha detectado en mezclas de ambas proteínas la formación de diferentes complejos Kis-Kid, habiéndose identificado desde el trímero Kis<sub>2</sub>Kid hasta el decámero Kis<sub>2</sub>Kid<sub>2</sub>Kis<sub>2</sub>Kid<sub>2</sub>Kis<sub>2</sub> (Kamphuis y col., 2007). En presencia de un ADN que contenga la región operadora promotora y en exceso de la antitoxina, el equilibrio entre la mezcla de complejos se desplaza hacia la formación del hetero-octámero Kis<sub>2</sub>Kid<sub>2</sub>Kis<sub>2</sub>Kid<sub>2</sub>, que se detecta como la única especie unida al ADN (Monti y col., 2007). Esto indica que el octámero

es la especie con mayor afinidad por la región operadora. Mediante ensayos de interacciones ADN-proteína se definió la región de unión en la región promotora operadora. Esta región contiene dos secuencias palindrómicas separadas por treinta y tres pares de bases a las que se une el complejo Kis-Kid con alta afinidad mediado por interacciones de la antitoxina Kis con el ADN. La toxina Kid actuaría como un cofactor ya que aumenta la afinidad de unión de la antitoxina por la región operadora (Monti y col., 2007).

La **figura 3** muestra el esquema de la organización genética y funcional del sistema *parD* (*kis*, *kid*) en el que se indican los diferentes niveles de su regulación.

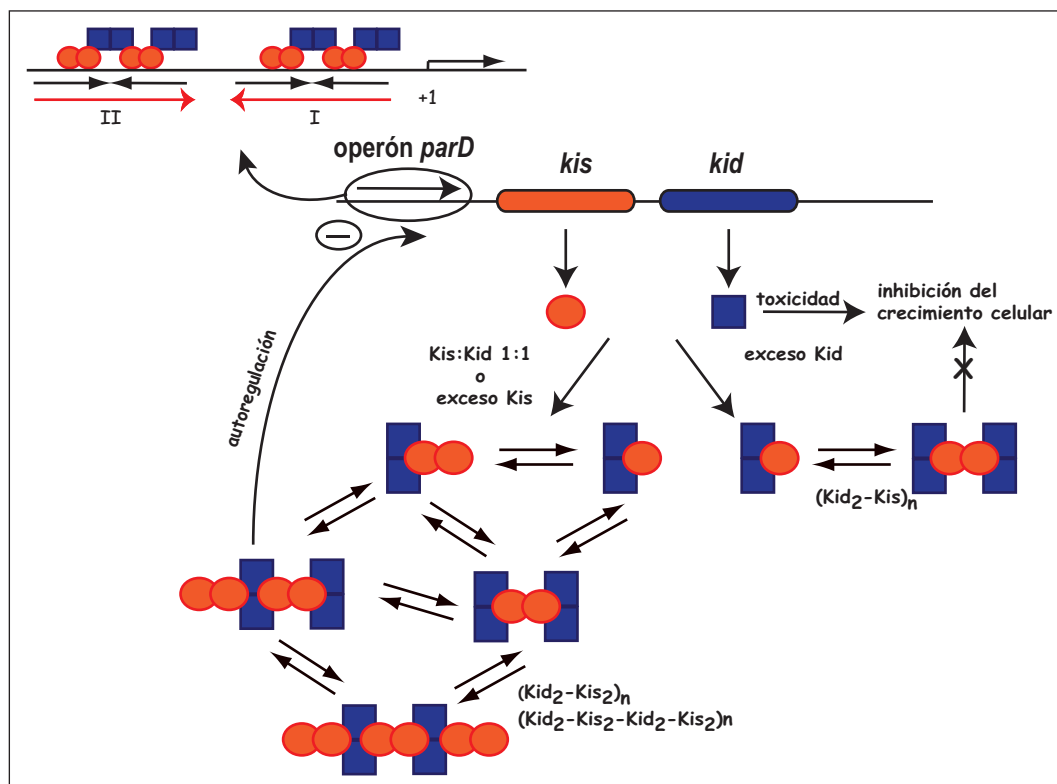


Figura 3.- Organización genética y funcional del sistema *parD* (*kis*-*kid*). El gen *kis* y la proteína Kis se muestra en amarillo y en círculos, mientras que la toxina Kid se muestra en azul y en cuadrados. Las diferentes combinaciones de círculos y cuadrados representan la estequiometría de los complejos Kis-Kid que ocurren en condiciones de exceso de antitoxina o de toxina.

La estructura cristalográfica de Kid ha sido resuelta (Hargreaves y col., 2002b) y muestra un alto grado de similitud con la toxina CcdB del sistema *ccd* del plásmido F, sugiriendo un ancestro común. Estudios de residuos implicados en la toxicidad de ambas proteínas señalaron que las zonas importantes se localizan en regiones distintas en la dos toxinas: la zona C-terminal es la más relevante en CcdB (Bahassi y col., 1995), mientras que en Kid se encontraron residuos relevantes en las zonas N-terminal y C-terminal (Santos-Sierra y col., 2003). Estas diferencias son consistentes con las distintas funciones de estas toxinas, ya que actúan sobre dianas distintas. Estudios no publicados realizados en colaboración con el grupo de Anthony Maxwell, indican que no existen indicios de actividades cruzadas en estas toxinas.

Nuestro grupo descubrió que la toxina Kid es una endoribonucleasa que corta ARNs en ausencia de ribosomas y que posee una especificidad de secuencia determinada: 5'-UA(C/A)-3' flanqueada frecuentemente por U en 3' o 5' (Muñoz-Gomez y col., 2005). El corte se produce con preferencia en 5' de la primera adenosina y en regiones de cadena sencilla, aunque se observaron cortes en regiones de doble cadena cuando se utilizaron altas concentraciones de proteína Kid. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por el grupo de Masanori Inouye con la toxina PemK del plásmido R100, que es idéntica a Kid (Zhang y col., 2004). Este grupo encontró que la toxina PemK corta ARN *in vitro* en la secuencia consenso 5'-UA(C/A/U)-3', el corte se produce con preferencia entre la U y la A en regiones de cadena sencilla, pero también se encuentran cortes a 3' de la A. Los cortes que PemK muestra *in vivo* mantienen la secuencia consenso 5'-UAC-3'. Se vio que esa toxina no era capaz de cortar ARN en regiones de doble cadena, ya que la actividad endoribonucleolítica *in vitro* quedaba inhibida cuando el ARN se hibridaba con ADN o ARN complementarios. Los resultados obtenidos en nuestro grupo indicaban que, aunque con menor eficiencia, algunas dianas presentes en regiones de doble banda también son cortadas. Para estudiarlo se utilizaron los ARNs CopA, CopT y TAR (de aproximadamente 100 nucleótidos) cuyas estructuras secundarias están bien caracterizadas, y por lo tanto se conocen las regiones de doble cadena intramoleculares. Sin embargo, al carecer de datos de la estructura secundaria de los ARNs utilizados por Zhang y colaboradores, no es posible realizar una comparación más rigurosa de la estructura secundaria de las regiones de corte. Pimentel y colaboradores encontraron que Kid corta con preferencia ARN *in vivo* en la secuencia 5'-UUACU-3', entre la U y la A (Pimentel y col., 2005). El corte en dicha diana en el ARNm policistrónico *copB-repA* del plásmido R1 a 3' del gen *copB*, resulta en la disminución de los niveles del controlador de replicación CopB y en un aumento en los niveles del mensajero de la proteína iniciadora de la replicación RepA y, por lo tanto, de la eficiencia de replicación. Estos datos dan una explicación mecánica a la interrelación entre el replicón básico del plásmido R1 y el sistema de estabilidad *parD*, que había sido previamente identificada en nuestro laboratorio (Ruiz-Echevarria y col., 1995b).

Mediante la utilización de sustratos de ARN mínimos, 5'-AUACA-3' y UpA, se ha propuesto un mecanismo de corte para la toxina Kid que implica la formación de un intermediario 2':3' fosfato cíclico, característico del mecanismo de corte de las ARNasas ciclantes como las ARNasas A, T1 o  $\alpha$ -sarcina (Lacadena y col., 1998, Steyaert, 1997, Kamphuis y col., 2006). El mecanismo básico de corte del ARN por Kid se inicia por un ataque nucleofílico del oxígeno en 2' de la ribosa unida al uracilo sobre el fosfato adyacente (**Figura 4, flechas rojas**). Una base catalítica activa el oxígeno atacante, mientras que un ácido catalítico dona un protón al oxígeno en 5' de la base saliente (**flechas rojas**). En un paso posterior, se forma un nucleótido 3'-monofosfato debido a la hidrólisis del grupo intermediario 2':3' fosfato cíclico. Existen además interacciones adicionales que estabilizan los intermediarios de corte. Los residuos implicados en este proceso se identificaron cuando se definió un modelo de la estructura del

complejo entre la toxina Kid y el sustrato no procesable 5'-AdUACA-3'. Dicho sustrato carece del 2'-OH en la ribosa necesario para el corte (**Figura 4**) (Kamphuis y col., 2006).

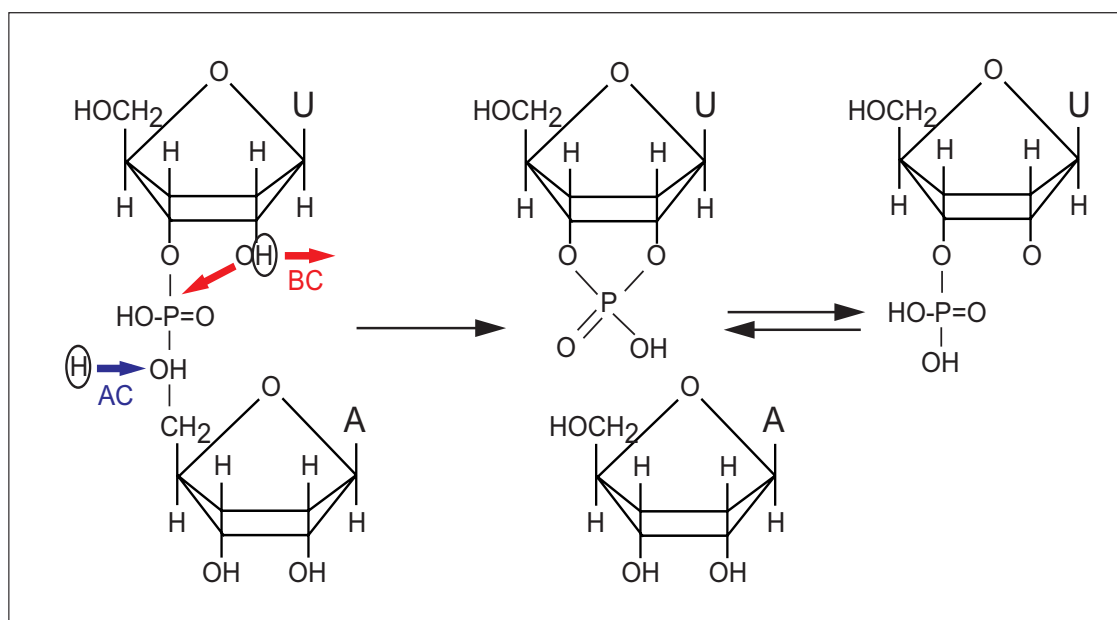


Figura 4.- Mecanismo de corte de la toxina Kid. Se muestra la rotura del dinucleótido UpA durante el progreso de la reacción de corte. BC: base catalítica, AC: ácido catalítico de la proteína. Las flechas rojas indican los principales pasos de iniciación del proceso de rotura del ARN.

El modelo de la estructura de este complejo se obtuvo por ajuste molecular del sustrato de ARN con la estructura de Kid predeterminada por RMN. Se obligó a que el modelo se ajustara: i) a las perturbaciones químicas inducidas por la interacción del sustrato no procesable en la toxina, ii) al mecanismo de corte propuesto, y iii) a la información disponible, limitada y provisional, de los mutantes no tóxicos de Kid. El modelo identifica dos superficies simétricas y continuas de unión de Kid al ARN, en las que participan residuos de ambos monómeros (**Figura 5**). La unión de una molécula de ARN a una superficie de unión impide la unión de otra molécula a la otra superficie simétrica. Con esta estructura resuelta, se identificaron residuos probablemente involucrados en la unión y corte del ARN (**ver Figura 5**). Los residuos implicados en la unión general del ARN se agrupan en 5 grupos: los grupos 1, 3 y 4 pertenecen al monómero A, mientras que los grupos 2 y 5 pertenecen al monómero B. El residuo E18 de un monómero y el R85 del otro monómero interaccionan mediante un puente salino. Mutaciones en estos residuos desestabilizan la estructura de la toxina y evitan su toxicidad (Santos-Sierra y col., 2003).



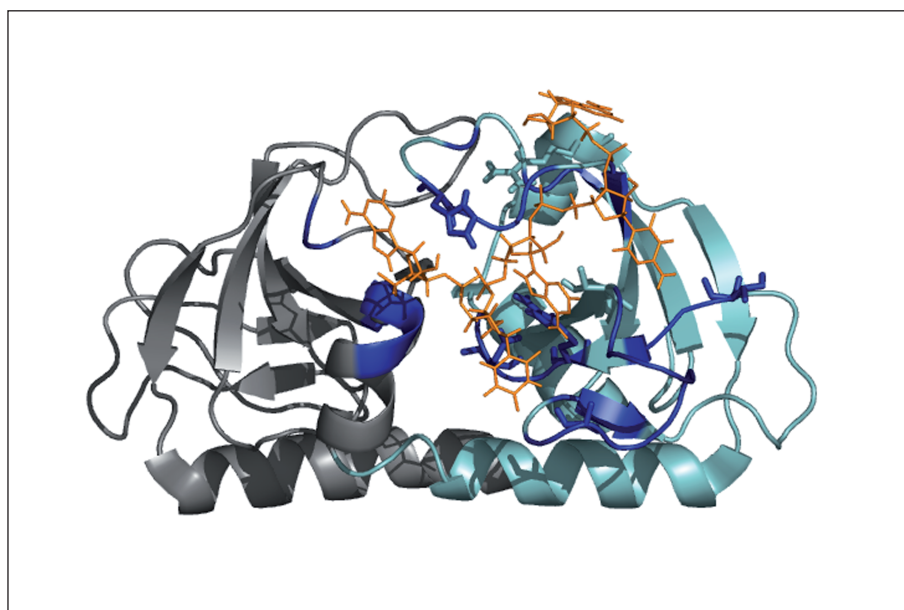


Figura 5.- Modelo de la interacción del ARN con la toxina Kid en una de sus 2 superficies de unión. Se muestran los dos monómeros de la proteína (gris y azul cielo) y las bases del sustrato ARN, 5'-AdUACA-3', en naranja interaccionando con una de las superficies de unión del dímero, en azul oscuro.

Con todos estos datos, se identificaron una serie de residuos que estarían implicados en la interacción con las bases de la secuencia consenso 5'-UAC-3', y que contribuirían a definir la especificidad de secuencia que reconoce esta toxina. Dichos residuos son: T46, S47, A55, F57, T69, V71 y R73 (**Figura 6A**). Este modelo propone también tres residuos: D75, R73 y H17, que actuarían en el centro catalítico de la proteína y que jugarían respectivamente el papel de base catalítica, ácido catalítico y residuo estabilizador (**Figura 6B**). Previamente se hallaron mutaciones en los residuos R73 y D75 que abolían la toxicidad de Kid (Santos-Sierra y col., 2003). Al comparar las secuencias de aminoácidos entre toxinas homólogas a Kid, se vio que el residuo R73 no se conservaba, mientras que un residuo ácido (D o E) en la posición 75, que podría actuar como base catalítica, esta presente en ChpAK (MazF) y otras muchas toxinas homólogas (Hargreaves y col., 2002b). Sin embargo, en ChpBK, una de las toxinas homólogas a Kid en el cromosoma de *E. coli* con actividad ribonucleasa, no existe este residuo ácido, sino una glutamina, teniendo dicha toxina menor actividad endoribonucleolítica en comparación a MazF.

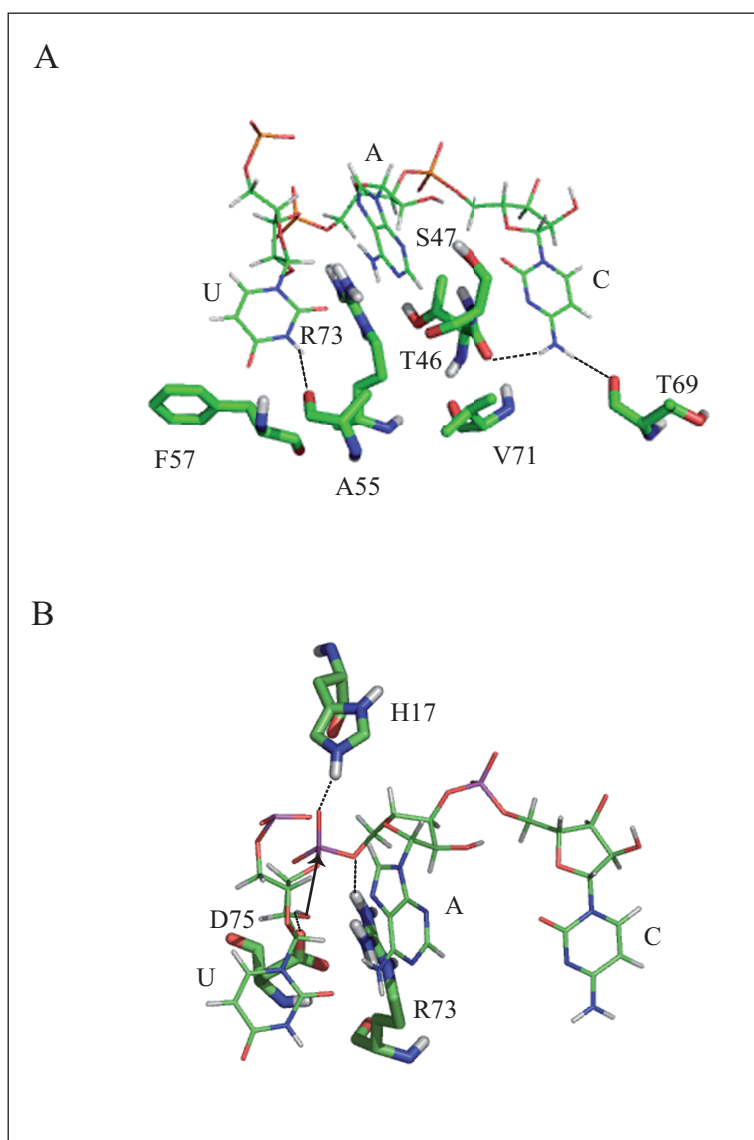


Figura 6.- Residuos de la toxina Kid que participan en la unión o en el corte del ARN. Se observan las bases de la secuencia de ARN 5'-UAC-3'. A) Se muestran los residuos que interaccionan con las bases de ARN; las líneas punteadas indican residuos que establecen puentes de hidrógeno. B) Residuos del centro catalítico, se indica el ataque nucleofílico y los contactos con las bases del ARN.

### 3 PROCESO DE TRADUCCIÓN EN PROCARIOTAS

Como se ha visto, muchos de los sistemas T-A que se conocen hasta la fecha actúan en algún nivel o sobre algún componente que participa en la síntesis de proteínas, por ello se va a describir brevemente el proceso de traducción [revisado por (Ramakrishnan, 2002)].

El proceso de traducción de proteínas en procariotas tiene lugar en el ribosoma donde, guiada por la secuencia de nucleótidos de ARNm, la maquinaria de traducción sintetiza una cadena polipeptídica con gran precisión y velocidad [revisado por (Green y Noller, 1997)]. El ribosoma está compuesto por dos subunidades, la 30S y la 50S, que al unirse forman el ribosoma 70S. Las subunidades tienen tres lugares de unión de ARNt: el sitio A, donde se sitúa el ARNt aminoacilado, el sitio P, donde se encuentra el ARNt con la cadena polipeptídica, y el sitio E, donde se localiza el ARNt deacilado antes de que abandone el ribosoma. Cada subunidad ejerce una función determinada. La subunidad 30S es la encargada de unirse al ARNm y al anticodón del ARNt y de monitorizar con gran precisión el apareamiento de bases entre el codón del ARNm y el anticodón del ARNt. La subunidad 50S une el aminoacil-



ARNt que va a aceptar la cadena polipeptídica y cataliza la formación del enlace peptídico entre el aminoácido del ARNt en el sitio A y la cadena naciente unida al ARNt del sitio P. La translocación de los ARNs, ARNt y ARNm entre un sitio y otro se realiza por la acción conjunta de ambas subunidades. El proceso de traducción consta de tres etapas bien diferenciadas: iniciación, elongación y terminación.

### 3.1 Iniciación.

En la iniciación la subunidad 30S interacciona con la secuencia Shine-Dalgarno del ARNm, ya que es complementaria al extremo 3' del ARNr 16S. En el proceso participan tres proteínas que actúan como factores de iniciación: IF1, IF2 e IF3. IF3 se une a la subunidad 30S impidiendo que ésta se una a la subunidad 50S, desestabilizando además la unión al sitio P de otros ARNt que no sean el iniciador, fMet-ARNt<sup>fMet</sup> (Hartz y col., 1990). IF1 se une al sitio A e incrementa la afinidad del IF2 por el ribosoma. IF2 es una GTPasa que se une sobre el sitio A y al ARNt iniciador. Al final de la etapa de iniciación, IF1 se sitúa en el sitio A al igual que IF2, el ARNt iniciador fMet-ARNt<sup>fMet</sup> permanece en el sitio P y el factor de iniciación IF3 en el sitio E.

### 3.2 Elongación.

Al final de la iniciación hay un ARNt iniciador aminoacetilado en el sitio P mientras que el sitio A queda vacío. Este sitio será ocupado por un ARNt aminoacetilado, el cual accede al ribosoma formando un complejo con el factor de elongación EF-Tu y GTP (Stark y col., 1997). Cuando el apareamiento entre el codón del ARNm y el anticodón del ARNt que entra en el sitio A es el correcto, se producen cambios conformacionales en el ribosoma que estabilizan la unión de ese ARNt y el GTP es hidrolizado por el factor EF-Tu. Esta hidrólisis hace que EF-Tu se libere del extremo aminoacil del ARNt localizado en el sitio A, dejándolo libre. Posteriormente se produce la acomodación del aminoacil-ARNt en el sitio A; en este paso el ARNt se reorienta hacia el sitio P en la subunidad 50S, formándose a continuación el enlace peptídico mediante la deacetilación del ARNt del sitio P y la transferencia de la cadena peptídica al ARNt del sitio A (Pape y col., 1998). En este momento el ribosoma tiene un ARNt deacetilado en el sitio P y un ARNt con la cadena peptídica en el sitio A. Una translocación de los ARNt facilitada por el factor de elongación EF-G, que al igual que EF-Tu es también una GTPasa, deja el ribosoma preparado para el siguiente paso de elongación de la cadena peptídica. El ribosoma en esta fase contiene un ARNt deacetilado en el sitio E, un ARNt con la cadena peptídica en el sitio P y un sitio A disponible para la entrada del siguiente aminoacil-ARNt. La **figura 7** muestra un esquema de la etapa de elongación del proceso de traducción.

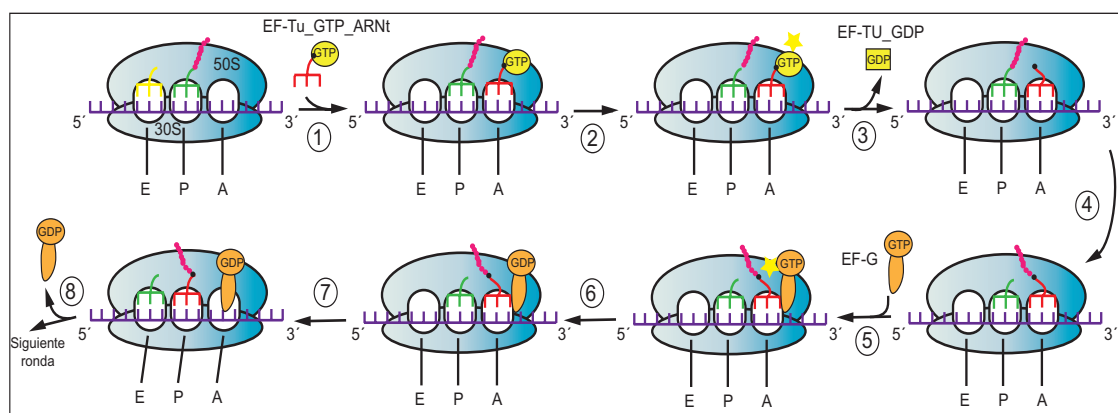


Figura 7.- Esquema de las principales etapas del proceso de elongación de la traducción. 1) Entrada del aminoacil-ARNt en complejo con el factor de elongación EF-Tu y GTP. 2) Tras el posicionamiento del aminoacil-ARNt en el sitio A se activa la función GTPasa del factor EF-Tu. 3) Se produce la hidrólisis del GTP que libera el extremo aminoacil del ARNt en el sitio A y el EF-Tu unido a GDP sale del ribosoma. Esto provoca la acomodación del ARNt, es decir, el ARNt sufre cambios conformacionales en los que se orienta hacia el sitio P del ribosoma. 4) Formación del enlace peptídico en el ARNt localizado en el sitio A. 5) Entrada del factor de elongación EF-G unido a GTP e hidrólisis del mismo. 6) El factor EF-G queda unido a GDP. 7) Translocación de los ARNt hacia los sitios E y P del ribosoma. 8) Salida del EF-G, el ribosoma está preparado para la siguiente ronda de elongación.

### 3.3 Terminación.

En la terminación de la traducción, se produce la liberación de la cadena peptídica sintetizada y la separación de las dos subunidades ribosomales que quedan disponibles para nuevos procesos de síntesis de proteínas. El proceso se inicia cuando un codón de terminación del ARNm entra en el sitio A del ribosoma. Este codón es reconocido por los factores de terminación de clase 1 (RF). En procariotas existen 2 factores de terminación, RF1 y RF2, que reconocen los codones de terminación UAA/UAG y UAA/UGA, respectivamente, situados en el centro de decodificación del sitio A (Scolnick y col., 1968). Ambas proteínas tienen un motivo tripeptídico GGQ que interacciona con el centro de transferencia peptídico (PTC) (Frolova y col., 1999). Esta interacción activa la hidrólisis del enlace peptídico y el ARNt en el PTC que libera la cadena sintetizada.

El reconocimiento de los codones de terminación por estas proteínas está mediado por un motivo tripeptídico del dominio central de ambas proteínas, PxT en RF1 y SPF en RF2 (Ito y col., 2000). Recientemente se ha confirmado que dichos dominios participan en el reconocimiento de los dos primeros nucleótidos del codón (Laurberg y col., 2008), explicando así la precisión con la que se reconoce la uridina en primera posición (Freistoffer y col., 2000). El reconocimiento de esta U está mediado por residuos cercanos al extremo de la hélice  $\alpha$ -5 del dominio central (Laurberg y col., 2008). La tercera base del codón se determina por dos bases cercanas al PxT, Q185 y T198, en RF1 (Laurberg y col., 2008).

Trabajos recientes han arrojado más luz al papel del motivo GGQ (Petry y col., 2005, Laurberg y col., 2008, Trobro y Aqvist, 2007). Dicho dominio junto con la base A76 de ARNt en

el sitio P, es el responsable del ataque nucleofílico necesario para romper el enlace peptídico.

Un tercer factor de clase 2, el RF3, con GTP o GDP, se une al complejo RF1/2 -ribosoma en el centro asociado a GTP de la subunidad 50S y disocia la interacción de RF1/2 (Freistroffer y col., 1997, Zavialov y col., 2001, Zavialov y col., 2002, Gao y col., 2007a).

Tras la salida de los RF del ribosoma, el factor de disociación del ribosoma RRF junto con el factor de elongación EF-G producen la disociación de las dos subunidades ribosomales que quedan disponibles para volver a participar en un nuevo proceso de síntesis proteica (Karimi y col., 1999, Gao y col., 2007b). El ARNt deacetilado situado en el sitio P de la subunidad 30S es liberado en un proceso en el que participa el factor de iniciación IF3 (Karimi y col., 1999, Peske y col., 2005).

La **figura 8** muestra en esquema de los diferentes pasos de la etapa de terminación del proceso de traducción en procariotas.

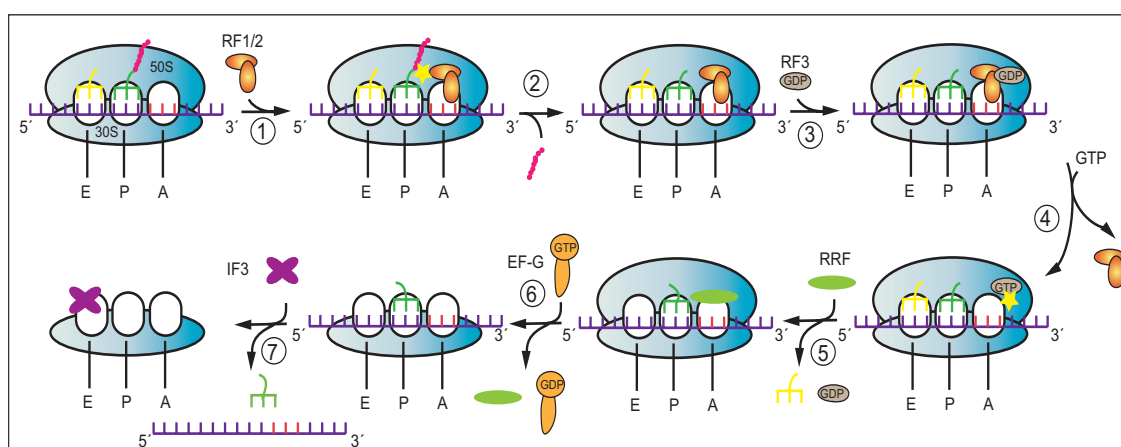


Figura 8.- Representación esquemática de los principales pasos que ocurren en la terminación de la traducción [adaptada de (Petty y col., 2008)]. 1) Tras el posicionamiento de un codón de terminación en el sitio del ribosoma se produce la entrada de un factor de clase I, RF1 o RF2. 2) El RF1 o RF2 hidrolizan el enlace de la cadena polipeptídica con el ARNt, provocando la liberación de dicha cadena peptídica. 3) Entrada del factor de clase II, RF3 unido a GDP. 4) El GDP se intercambia por GTP provocando cambios conformacionales que provocan la salida del factor de clase I del sitio A del ribosoma. 5) el GTP es hidrolizado por RF3 produciendo la salida del RF3 y la unión del factor de terminación RRF y la salida del ARNt situado en el sitio E. 6) Entrada del factor EF-G unido a GTP, este GTP es hidrolizado provocando la salida del RRF, y EF-G unido a GDP y la disociación de la subunidad 50S. 7) La subunidad 30S es accesible para el factor de iniciación IF3, y éste se une al sitio E provocando la salida del ARNm y del ARNt que estaba colocado en el sitio P.

El modelo del mecanismo de acción de la toxina Kid del sistema *parD* es el punto de partida para estudios de validación del mismo. La actividad ARNasa de la toxina está en la base de su potencial como inhibidor de síntesis de proteínas. En la presente tesis doctoral también se explora la interacción funcional de la toxina Kid con componentes de la maquinaria de traducción y, en particular, con el factor de terminación de traducción RF1. Este análisis saca partido de la disponibilidad de nuevos mutantes en el gen *prfA* que afectan a este factor de terminación y que habían sido previamente obtenidos en nuestro laboratorio.

#### **IV. OBJECTIVES**



The objectives of this thesis based on the available data are:

- 1.- To perform a mutagenesis evaluation of the model of the RNase mechanism of the Kid toxin by mass spectrometry. This evaluation is required as the structure of the Kid toxin and the RNA substrate is a model relaying on the docking of the RNA on the protein.
- 2.- To explore the possible involvement, in the inhibition of protein synthesis, of Kid interactions with components of the ribosome machinery, taking advantage of novel mutations previously isolated in our laboratory in *prfA*, the gene encoding the polypeptide releasing factor RF1 of *Escherichia coli*. This factor was reported to be involved in the *in vitro* cleavage of mRNA by RelE toxin. This objective intends to qualify the statement that the inhibition of protein synthesis by Kid, is only due to the ribosomal independent cleavage of RNAs.



## V. MATERIALES Y MÉTODOS





## 1 MATERIALES

### 1.1 Cepas bacterianas.

En la tabla 2 se muestra la procedencia y el genotipo de las estirpes bacterianas de *E. coli* usadas en este trabajo.

Tabla 2.- Estirpes bacterianas utilizadas en esta tesis.

Estirpe	Genotipo	Referencia
OV2	F, <i>leu</i> , <i>thyA</i> (deo), <i>ara</i> (am), <i>lac</i> -125 (am), <i>galU</i> 42, <i>galE</i> , <i>trp</i> (am), <i>tsx</i> (am), <i>tyr</i> ( <i>supF</i> (ts)A81), <i>ile</i> , <i>his</i>	(Donachie y col., 1976)
TG1	<i>supE</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proB</i> ), <i>thi1</i> , <i>hsd</i> $\Delta$ 5, F' ( <i>traD</i> 36, <i>lacIq</i> , <i>lacZ</i> M15, <i>proAB</i> <sup>+</sup> )	(Sambrook y col., 1989)
MLM373	CSH16, F', $\Delta$ ( <i>lac,pro</i> ), <i>supE</i> , <i>thi</i>	(Santos-Sierra y col., 2003)
MC1061	F' <i>hsdR</i> 2, <i>hsdM</i> <sup>+</sup> , <i>hsdS</i> <sup>+</sup> , <i>araD</i> 139, $\Delta$ ( <i>ara,leu</i> ), <i>spoT</i> 1, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR)	(Casadaban y Cohen, 1980)
KR19	MC1061, <i>prfA</i> 301	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
KR4	MC1061, <i>prfA</i> 303	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
KR17	MC1061, <i>prfA</i> 121	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
MRA8	MG1655, <i>prfA</i> 1(ts)	(Zhang y col., 1994)

### 1.2 Plásmidos.

La procedencia y las características más relevantes de los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.- ADNs plasmídicos utilizados en este trabajo.

Nombre	Parental	Genotipo relevante/uso	Marcador de selección	Referencia
pAB1120	pAB112 (R1)	<i>parD</i> ( <i>kis74(amb)</i> , <i>kid</i> <sup>+</sup> ), <i>copB</i> <sup>-</sup>	Km	(Bravo y col., 1988)
pAB17	pKN1562	<i>parD</i> ( <i>kis18</i> , <i>kid</i> <sup>+</sup> )	Km	(Bravo y col., 1987)
pAB24	pKN1562 y pBR322 (pMB9)	<i>parD</i> <sup>+</sup>	Tc	(Bravo y col., 1987)
pBR322	pMB9		Ap, Tc	(Bolívar y col., 1977)
pRG-his-KisKid	pRG- <i>recA</i> -NHis, pMB9	<i>parD</i> <sup>+</sup> , vector de expresión	Ap	Dra. Rosario Sabariegos-Jareño (no publicado)

pRG-his-KisKidD75N	pRG-his-KisKid	<i>kidD75N</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pRG-his-KisKidD75E	pRG-his-KisKid	<i>kidD75E</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pRG-his-KisKidH17P	pRG-his-KisKid	<i>kidH17P</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pRG-his-KisKidR73H	pRG-his-KisKid	<i>kidR73H</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pRG-his-KisKidA55G	pRG-his-KisKid	<i>kidA55G</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pRG-his-KisKidT69G	pRG-his-KisKid	<i>kidT69G</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pRG-his-KisKidE91K	pRG-his-KisKid	<i>kidE91K</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pRG-KisKidR85W	pRG-his-KisKid	<i>kidR85W</i>	Ap	(Santos-Sierra y col., 2003)
pRG-his-KisKidT46G	pRG-his-KisKid	<i>kidT46G</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pRG-his-KisKidT46GT69G	pRG-his-KisKid	<i>kidT46GT69G</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pRG-his-KisKidA55GT46G	pRG-his-KisKid	<i>kidA55GT69G</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pRG-his-KisKidC74SC11STOP	pRG-his-KisKid	<i>kidC74SC111</i>	Ap	Este trabajo
pAB24-D75N	pAB24	<i>kidD75N</i>	Tc	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pAB24-D75E	pAB24	<i>kidD75E</i>	Tc	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pAB24-H17P	pAB24	<i>kidH17P</i>	Tc	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pAB24-R73H	pAB24	<i>kidR73H</i>	Tc	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pAB24-A55G	pAB24	<i>kidA55G</i>	Tc	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)

pAB24-T69G	pAB24	<i>kidT69G</i>	Tc	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pAB24-E91K	pAB24	<i>kidE91K</i>	Tc	(Lemonnier y col., 2004)
pAB24-R85W	pAB24	<i>kidR85W</i>	Tc	Juan López-Villarejo (no publicado)
pMLM132	pMLM1	<i>PparD::lacZ</i>	Cm	(Santos-Sierra y col., 2003)
pBR322-1120	pBR322	<i>parD (kis74amb,kid*)</i>	Cm	Santos-Sierra (no publicado)
pBR322-1120-D75E	pBR322-1120	<i>kis, kidD75E</i>	Cm	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pBR322-1120-H17P	pBR322-1120	<i>kis, kidH17P</i>	Cm	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pBR322-1120-R73H	pBR322-1120	<i>kis, kidR73H</i>	Cm	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pBR322-1120-T46G	pBR322-1120	<i>kis, kidT46G</i>	Cm	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pBR322-1120-A55G	pBR322-1120	<i>kis, kidA55G</i>	Cm	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pBR322-1120-T69G	pBR322-1120	<i>kis, kidT69G</i>	Cm	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pBR322-1120-T46G/ T69G	pBR322-1120	<i>kis, kidT46GT69G</i>	Cm	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pBR322-1120-A55G/ T69G	pBR322-1120	<i>kis, kidA55GT69G</i>	Cm	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009a)
pB24	pBR322-1120	<i>kis, kidR85W</i>	Cm	(Lemonnier y col., 2004)
pAB1120-D75N	pAB1120	<i>kis74amb, kidD75N</i>	Km	(Santos-Sierra y col., 2003)
pKK1120	pACYC184	<i>parD (kis74amb,kid*),</i>	Tc	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
pMLM1	mini-F,	<i>repFIA+, sop+</i>	Cm	(Lemonnier y col., 2000)
pBAD18	pBR322	Vector de expresión, Para	Ap	(Guzman y col., 1995)
pELI01	pBAD18	<i>Para::prfA121, amp</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)

pELI02	pBAD18	<i>Para::prfAwt, amp</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
pELI03	pBAD18	<i>Para::prfA301, amp</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
pELI04	pBAD18	<i>Para::prfA304, amp</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
pFUS2	pMB1	Vector de expresión, <i>Para</i>	Km	(Lemonnier y col., 2000)
pNDM220	Mini-R1	Vector de expresión, <i>Plac</i>	Ap	(Gotfredsen y Gerdes, 1998)
pELI05	pFUS2	<i>Para::kis</i>	Km	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
pELI06	pFUS2	<i>Para::kis74</i>	Km	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
pELI07	pNDM220	<i>Plac::relE</i>	Ap	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
pELI08	pFUS2	<i>Para::prfAwt</i>	Km	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
pELI09	pFUS2	<i>Para::relB</i>	Km	Este trabajo (Diago-Navarro y col., 2009b)
pBESTluc <sup>TM</sup>	pMB9	<i>Ptac::luc</i>	Ap	Promega
pG3TAR	R1	Clonación de <i>tar</i> en pGEM <sup>®</sup> 3Z	Ap	(Perez_Ruiz y col., 1999)
pGW644	R1	Amplificación de <i>copA</i> y <i>copT</i>	Ap	(Persson y col., 1988)
pY104	pFUS2	<i>Para::eyfp</i>	Km	(Nieto y col., 2006)
pELI10	pY105	<i>Para::eyfp-kid</i>	Km	Este trabajo
pFUSKid	pFUS2	<i>Para::kid</i>	Km	Lemonnier, M (no publicado)
pSS100	pNDM100	<i>Plac::kid</i>	Ap	Santos-Sierra (no publicado)

### 1.3 Productos químicos.

Se utilizaron productos químicos de las casas comerciales Sigma, Fluka, Serva, Merck, Gibco, Panreac, Roche Applied Biosciences y GE Healthcare.

### 1.4 Enzimas de restricción de ADN y ARN.

Las enzimas utilizadas fueron suministradas por las casas comerciales New England

Biolabs, Promega, Sigma, GE Healthcare, Invitrogen, Qiagen, Roche Applied Biosciences y Ambion.

### 1.5 Mutagénesis del ADN.

Para introducir cambios en un codon determinado en la proteína Kid se utilizó el kit QuikChange® XL II Site-Directed Mutagénesis de Stratagene.

### 1.6 Tampones y soluciones.

#### ✓ Tampón de electroforesis Tris-Acetato (TAE) (1X)

Tris Base	40 mM
Ácido acético	20 mM
EDTA	2 mM
pH 9,0	

#### ✓ Tampón de electroforesis Tris-Borato (TBE) (1X)

Tris Base	50 mM
Ácido bórico	50 mM
EDTA	1 mM
pH 8,5	

#### ✓ Tampón de electroforesis MOPS (1X)

MOPS	20 mM
CH <sub>3</sub> COONa	5 mM
EDTA	1 mM
pH 7,0	

#### ✓ Tampón de electroforesis de proteínas (*Running buffer*) (1X)

Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1 % (p/v)
pH 8,5	

#### ✓ Tampón TE (1X)

Tris-HCl pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM

#### ✓ Solución no desnaturizante para carga de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Glicerol	50 %
Xilencianol	0,1 % (p/v)

Azul de Bromofenol	0,1 % (p/v)
EDTA	10 mM
✓ <u>Tampón formamida (F): solución desnaturalizante de formamida para carga de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida (2X)</u>	
Formamida desionizada	94 % (v/v)
Xilencianol	0,025 % (p/v)
Azul de Bromofenol	0,025 % (p/v)
EDTA	17 mM
✓ <u>Solución desnaturalizante para carga de proteínas en geles SDS-PAGE (<i>Loading buffer</i>) (5X)</u>	
Tris-HCl pH 6,8	50 mM
SDS	10 %
EDTA	10 mM
Glicerol	25 % (p/v)
Azul de bromofenol	0,5 g/l
β-mercaptoetanol	5 % (v/v)
✓ <u>Tampón de elución de ADN a partir de geles de poliacrilamida (1X)</u>	
NaCl	20 mM
Tris-HCl pH 7.4	20 mM
EDTA pH 8,0	2 mM
✓ <u>Tampón de elución de ARN a partir de geles de poliacrilamida (1X)</u>	
NH <sub>4</sub> Ac	50 mM
SDS	0,1 % (p/v)
EDTA pH 8,0	1 mM
✓ <u>Tampón dilución de proteínas purificadas (1X)</u>	
KCl	100 mM
HEPES	20 mM
pH 7,5	
✓ <u>Solución de poliacrilamida al 40 % (19:1) para electroforesis de ácidos nucleicos</u>	
Acrilamida	380 g/l
Bisacrilamida	20 g/l

✓ Solución de poliacrilamida al 30 % (29:1) para electroforesis de proteínas

Acrilamida	292 g/l
Bisacrilamida	8 g/l

✓ Tampón de unión para ensayos de retardo en gel

Tris-HCl pH 8,0	70 mM
KCl	200 mM
MgCl <sub>2</sub>	14 mM
NaCl	80 mM
EDTA	40 mM
BSA	100 µg/ml
Glicerol	0,5 % (v/v)

✓ Solución de lavado en los ensayos de síntesis de proteínas *in vivo* marcadas con <sup>35</sup>S

KCl	3 mM
NaCl	68 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9 mM

✓ Tampón MS para espectrometría de masas

CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	100 mM
pH 6,7	

✓ Tampón de perfiles ribosomales (RBP)

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NH <sub>4</sub> Cl	50 mM
Ditiotreitol	5 mM

**1.7 Medios de cultivo.**✓ Medio LBT líquido

Bactotripton	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l
Timina	20 mg/l
pH 7,0	

Se añadió agar bacteriológico (Pronadisa) a 15 g/l para obtener el medio LBT sólido.



✓ 2xTY

Tryptona	16 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	5 g/l
pH 7,4	

### 1.8 Isótopos radioactivos.

Para el marcaje de proteínas *in vivo* o *in vitro* se utilizó una mezcla de isótopos de <sup>35</sup>S metionina y <sup>35</sup>S cisteína (80:20), con actividad específica de 1000 Ci/mmol. Para el marcaje *in vitro* de ARN y ADN en su extremo 5', se empleó [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, con una actividad específica de 3000 Ci/mmol. Los isótopos fueron suministrados por Amersham Biosciences y por Hartmann Analytic GMBH.

### 1.9 Material autorradiográfico.

Las películas autorradiográficas utilizadas fueron suministradas por AGFA. Las pantallas amplificadoras utilizadas fueron suministradas por las casas comerciales Amersham Biosciences y Dufowt.

### 1.10 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados para realizar mutagénesis dirigida, para amplificar fragmentos cromosómicos, para obtener ADN bicatenario o para utilizar en la espectrometría de masas, se muestran en la tabla 4. Los oligonucleótidos de ADN fueron sintetizados en el Servicio de Química de Proteínas del CIB mediante química de fosforamidas. Los oligonucleótidos de ARN fueron suministrados por la empresa Biolegio.

Tabla 4.- Oligonucleótidos de ADN y ARN utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Utilización
PD75E(-)	TTGTACGTTGCGAACAACCCCGGACAAT	Introduce cambio GAT-GAA en D75 (Asp75Glu en <i>kid</i> )
PD75E(+)	ATTGTCCGGGGTTGTTTCGCAACGTACAA	Introduce cambio ATC-TTC en D75 (Asp75Glu en <i>kid</i> )
PD75N(-)	TTGTACGTTGCAATCAACCCCGGACAAT	Introduce cambio GAT-AAT en D75 (Asp75Asn en <i>kid</i> )
PD75N(+)	ATTGTCCGGGGTTGATTGCAACGTACAA	Introduce cambio ATC-ATT en D75 (Asp75Asn en <i>kid</i> )
PR73H(-)	ACCACAGGTGTTGTACATTGCGATCAACC	Introduce cambio CGT-CAT en R73 (Arg73His en <i>kid</i> )
PR73H(+)	GGTTGATCGCAATGTACAACACCTGTGGT	Introduce cambio ACG-ATG en R73 (Arg73His en <i>kid</i> )

PH17P(-)	TCCTACCGCAGGTCCTGAGCAGCAGGGA	Introduce cambio CAT-CCT en H17 (His17Pro en <i>kid</i> )
PH17P(+)	TCCCTGCTGCTCAGGACCTGCGGTAGGA	Introduce cambio ATG-AGG en H17 (His17Pro en <i>kid</i> )
PA55G(-)	TTTGCCCGCACTGGCGGCTTTGCGGTGTC	Introduce cambio GCC-GGC en A55 (Ala55Gly en <i>kid</i> )
PA55G(+)	GACACCGCAAAGCCGCCAGTGCGGGCAAA	Introduce cambio GGC-GCC en A55 (Ala55Gly en <i>kid</i> )
PT69G(-)	TTGGCATACGTACCACAGGTGTTGTAC	Introduce cambio ACA-GGA en T69 (Thr69Gly en <i>kid</i> )
PT69G(+)	GTACAACACCTCCGGTACGTATGCCAA	Introduce cambio ACA-GGA en T69 (Thr69Gly en <i>kid</i> )
PE91K(-)	GGAAAACGACTCAAACGGGTTCCGGAGACT	Introduce cambio GAA-AAA en E91 (Glu91Lys en <i>kid</i> )
PE91K(+)	AGTCTCCGGAACCCGTTTGAGTCGTTTCC	Introduce cambio TTC-TTT en E91 (Glu91Lys en <i>kid</i> )
KISKIDRG	CAGCAGCCATCATCATCATC	Hibrida a 3' de Kid (secuenciación de mutantes del operón <i>parD</i> )
ARNI	AdUACA	Ensayos de unión de Kid a ARN
ARNII	UUACU	Ensayos de actividad ARNasa de Kid
ARNIII	AUACA	Ensayos de actividad ARNasa de Kid
PRL (+)	GACAGCTAGCGGCTGGAGTA	Amplifica el gen <i>prfA</i> cromosómico e introduce diana <i>NheI</i> (subrayada)
PRR (-)	GGTAGCATGCTCCAGCAGGATTC	Amplifica el gen <i>prfA</i> cromosómico e introduce diana <i>SphI</i> (subrayada)
KIS5N (+)	GGCGAGCATATGGAGGTGAAGAAT	Amplifica el gen <i>kis</i> de los plásmidos derivados de R1 e introduce diana <i>NdeI</i>
KIS CTR (-)	GCTGGATCCTCAGATTTCCTCCTGAC	Amplifica el gen <i>kis</i> de los plásmidos derivados de R1 e introduce diana <i>BglII</i>
relB1 (+)	CCCCCGCATATGTAATTACAAGAGGTGTAAGAC	Amplifica el gen <i>relB</i> cromosómico e introduce diana <i>NdeI</i>
relB2 (-)	CCCCCTCGAGAAGCTTCAGAGTTCATCCAGCG TCACACGTACTGG	Amplifica el gen <i>relB</i> cromosómico e introduce diana <i>NdeI</i>
PNDM5 (+)	TTCAATTGTGAGCGGATAAC	Secuenciación de las construcciones en pNDM220
FUS4	AGACCGCTTCTGCGTTCT	Secuenciación de las construcciones en pFUS2
UpA	GTTGAAAGTTATATTTTATTAAACATTGTGC	Hibrida con UpB para formar la región I del operador <i>parD</i>
UpB	GCACAATGTTTAATAAAAAATATAACTTTCAAC	Hibrida con UpA para formar la región I del operador <i>parD</i>
DownA	GTGGATGTTATATTTAAATATAACTTTTATGGAG GTG	Hibrida con DownB para formar la región II del operador <i>parD</i>

DownB	CACCTCCATAAAAGTTATATTTAAATATAACATC CAC	Hibrida con DownB para formar la región II del operador <i>parD</i>
PT7CopA	TAATACGACTCACTATAGGCATAGCTGAATTG TTGG	Amplificación de <i>copA</i>
CopAR	GCCAGAAAAGCAAAAACC	Amplificación de <i>copA</i>
PT7CopT	TAATACGACTCACTAGCCAGAAAAGCAAAAACC	Amplificación de <i>copT</i>
CopTR	GCATAGCTGAATTGTTGG	Amplificación de <i>copT</i>
KidN (+)	GGCGGGTACCATGGAAAGAGGGGAAATCTGGC	Amplificación de <i>kid</i> e introduce diana KpnI
KidCTerBam (-)	GCTGGATCCTCAAGTCAGAATAGTGGACAG	Amlificación <i>kid</i> e introduce diana BamHI

(+) Indica que la secuencia del oligonucleótido es igual a la cadena codificante del gen, mientras que (-) indica que la secuencia es complementaria a la región codificante del gen.

### 1.11 Secuenciación.

Todos los ADNs fueron secuenciados en el servicio de secuenciación del CIB (SECUGEN).

### 1.12 Programas informáticos.

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron los siguientes programas informáticos:

- ✓ Microsoft Office: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Outlook, Microsoft PowerPoint. Microsoft Inc.
- ✓ Internet Explorer. Microsoft Inc.
- ✓ MassLynx™ 4.0 Software. Waters Corp.
- ✓ Adobe CS3 Suite: Adobe Photoshop, Adobe Illustrator, Adobe In Design, Adobe®.
- ✓ SigmaPlot 9.0. SYSTAT Software Inc.
- ✓ DataMax v2.20.
- ✓ Picolog Data Acquisition Software. Pico Technology Limited
- ✓ Clone Manager Suite 7. Scientific & Educational Software 1992-1994.
- ✓ Quantity One. 2006 Bio-Rad Laboratories, Inc
- ✓ SOMCD: <http://geneura.ugr.es/cgi-bin/somcd/som.cgi?start=1>

## 2 MÉTODOS

### 2.1 Cultivo y conservación de *E. coli*.

Para el cultivo en medio sólido se utilizó LB-agar suplementado con timina (LBT-agar coloquialmente). Las bacterias se incubaron a 30, 37 ó 42 °C (según requerimientos de la estirpe), durante un tiempo variable entre 12-24 horas.

El cultivo en medio líquido se realizó en medio LB suplementado con timina (LBT coloquialmente), incubándose con fuerte agitación a 30, 37 ó 42 °C según necesidades. El seguimiento de los cultivos se realizó por turbidimetría, midiendo su absorbancia a 600 nm a diferentes tiempos, utilizando un espectrofotómetro HITACHI U-1100.

Los medios fueron suplementados con antibióticos o azúcares según los requerimientos de la estirpe.

Las diferentes estirpes se conservaron a -70 °C. Para ello, se crecieron cultivos en LBT, con el antibiótico adecuado, durante una noche a 30 ó 37 °C. Posteriormente, 4 ml de cultivo saturado se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos. El sedimento fue resuspendido en 1 ml de LBT conteniendo glicerol estéril al 10 % y, seguidamente, las células fueron congeladas a -70 °C.

### 2.2 Transformación de *E. coli*.

Las células competentes se prepararon siguiendo el método del  $\text{CaCl}_2$  (Hanahan, 1983, Lederberg y Cohen, 1974). Después de su puesta en competencia se transformaron empleando el método del choque térmico (Sambrook y Pollack, 1974). Si las células competentes iban a ser almacenadas a -70 °C, se añadió glicerol a una concentración final del 10 %.

Para preparar células competentes para electroporación se siguió el método descrito anteriormente con ligeras modificaciones (Miller y Nickoloff, 1995). Los lavados de las células se realizaron con  $\text{H}_2\text{O}$  estéril en lugar de con glicerol 10%. La electroporación se llevó a cabo de manera similar a como se ha descrito previamente (Dower y col., 1988). Se utilizó el electroporador MicroPulser™ de Bio-Rad.

### 2.3 Manipulación general de ADN.

#### 2.3.1 AISLAMIENTO DE ADN

##### ✓ Aislamiento de ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico de *E. coli* se llevó a cabo mediante el kit *High Pure Plasmid Isolation* de Roche Molecular Biochemical o mediante el método de la lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979).

##### ✓ Aislamiento de ADN genómico

La extracción de ADN cromosómico se realizó siguiendo el método descrito anteriormente (Projan y col., 1983) con ligeras modificaciones. Tras recolectar las células de 2 ml de cultivo,

éstas se resuspendieron en 300 µl de tampón (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y sacarosa 20%). Seguidamente, se añadieron 6 µl de lisozima (10 mg/ml) y tras una incubación de 20 minutos a 4 °C, se adicionaron 12 µl de Proteinasa K (5 mg/ml) y 3 µl de ARNasa (5 mg/ml) permitiéndose la incubación a 37 °C 90 minutos más. Posteriormente, se añadieron 30 µl de SDS 10% y las muestras se incubaron 5 minutos a 4 °C. Tras fenolizar y precipitar el ADN genómico de esta muestra, se resuspendió en H<sub>2</sub>O y se utilizó como molde en reacciones de amplificación de ADN.

### 2.3.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación de secuencias de ADN genómicas o plasmídicas se realizó en 100 µl de reacción que contenía: dNTPs 200 µM, 10 µl tampón Pfu polimerasa de Biolabs, 2 µM de cada oligonucleótido a utilizar, mientras que la concentración de molde genómico fue variable.

El termociclador utilizado fue *Mastercycler gradient* de Eppendorf.

### 2.3.2 ELECTROFORESIS DE ADN

Se usaron geles horizontales de agarosa al 0,8 y 2 % según el tamaño del ADN a analizar. La electroforesis se realizó en tampón TAE (1X), a voltaje constante (100V). Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (1,0 µg/µl) y el ADN se visualizó mediante la emisión de fluorescencia del Bromuro de Etidio irradiado con luz UV.

Para los ensayos de retardo en gel se utilizaron geles verticales de poliacrilamida al 5%, en tampón TBE (1X). La electroforesis se realizó a voltaje constante (100V).

### 2.3.3 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

La purificación de fragmentos de ADN de tamaño superior a 300 pb, se realizó a partir de geles de agarosa, utilizando el sistema QIAquick de Qiagen, siguiendo las instrucciones de la casa comercial, o mediante fenolización y precipitación del ADN.

Los fragmentos de ADN de pequeño tamaño se purificaron a partir de geles de poliacrilamida. Las bandas de ADN fueron cortadas y el ADN fue extraído por incubación a 42 °C durante 16 horas con tampón de elución de fragmentos de gel. El ADN se recuperó por extracción fenólica y precipitación.

### 2.3.4 CUANTIFICACIÓN

El ADN se cuantificó por espectrofotometría usando los coeficientes de extinción de: 50 (µg/ml) cm<sup>-1</sup> para ADN de cadena doble, 33 (µg/ml) cm<sup>-1</sup> para ADN de cadena sencilla y 40 (µg/ml) cm<sup>-1</sup> para ARN. Las medidas de absorbancia se realizaron a 260 nm.

### 2.3.5 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Los cambios de bases en el gen *kid* se introdujeron en los plásmidos pRGhisKisKid, pAB24, pBR-1120 y pFUSKid siguiendo las recomendaciones indicadas en el kit QuikChange® XL II Site-Directed Mutagenesis de Stratagene.

## 2.4 Manipulación general de ARN.

### 2.4.1 TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

Los ARNs usados, CopA, CopT y TAR fueron preparados según el método descrito anteriormente (Munoz-Gomez y col., 2004). Se utilizaron como moldes ADNs plasmídicos linearizados o productos de reacciones de amplificación de PCR. Las reacciones fueron catalizadas por la T7 ARN polimerasa en un volumen de 50 µl con 1-2 µg de ADN molde en tampón conteniendo Tris-HCl 40 mM pH 7,9, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, espermidina 2 mM; NaCl 10 mM, DTT 20 mM, 0,001 %. Tritón X100, NTPs 1mM de cada uno, 0,5 U/µl inhibidor de ARNasa y 0,5 U/µl de T7 ARN polimerasa. Se incubó durante 2 horas a 37 °C, eliminándose el molde con la enzima RQ DNasaI de Promega.

### 2.4.2 ELECTROFORESIS EN GELES VERTICALES DESNATURALIZANTES DE UREA-POLICRILAMIDA

Se utilizó una solución de poliacrilamida al 40 %. Para la purificación de ARN se utilizaron geles preparativos de 1,5 cm de grosor, mientras que los analíticos fueron de 0,8 cm. Los geles medían 17 cm de longitud y se prepararon al 4 % de poliacrilamida (p/v) para geles preparativos, o al 8 % para analíticos. En todos los casos contenían 7 M de urea en tampón TBE (1X). Tras una pre-electroforesis de 30 minutos a una intensidad de corriente de 36 mA, las muestras en tampón F, que habían sido previamente desnaturalizadas a 95 °C durante 2 minutos, se cargaron en el gel. La separación de las moléculas se llevo a cabo a la misma intensidad de corriente durante un tiempo variable según su tamaño y el porcentaje de acrilamida del gel. Posteriormente, tras transferir a papel Whatman, los geles se secaron al vacío a 80 °C durante 2 horas.

### 2.4.3 PURIFICACIÓN DE ARN A PARTIR DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Tras la electroforesis, el ARN se visualizó y se localizó en el gel por exposición autorradiográfica durante varios minutos. Cuando el ARN no estaba marcado radiactivamente, se localizó por *UV shadowing*. En este caso, el gel se coloca sobre una placa de silicagel 60 F254 y se irradia con epiluminiscencia UV a 254 nm, que excita el fluorocromo de la placa. La región del gel en la que se encuentren las moléculas de ARN, absorbe parcialmente la luz UV emitida por la placa y, por lo tanto, esa zona aparece sombreada en el gel.

Tras su localización se escindió el fragmento del gel que las contenía, y se fragmentó con una cuchilla estéril. Se añadieron 350 µl de tampón de elución y los fragmentos se incubaron

a 4 °C durante 16 horas. El ARN se recuperó por extracción fenólica, precipitación y lavados con etanol 80 %.

## **2.5 Técnicas generales con proteínas.**

### **2.5.1 PURIFICACIÓN DE KIS Y KID**

La purificación de las proteínas Kis, con o sin cola de 6 histidinas, y de las distintas proteínas Kid, silvestre y mutantes, se llevó a cabo siguiendo el protocolo de purificación por cromatografías de afinidad y de intercambio iónico desarrollado por los Drs. Rafael Giraldo y Ramón Díaz-Orejas (Hargreaves y col., 2002a) con ligeras modificaciones. Tras la inducción y procesamiento de los cultivos, los extractos celulares se cargaron en una columna de cromatografía de afinidad por níquel (Ni-IMAC). Los complejos his-Kis-Kid retenidos en la columna fueron disociados en varios pasos. En primer lugar, se eluyó Kid mediante tratamiento con un agente desnaturizante (hidrocloruro de guanidinio 5 M e imidazol-HCl 20mM pH=8,0). Seguidamente, se eluyó his-Kis mediante la adición de 50 mM EDTA al hidrocloruro de guanidinio 5 M y 20 mM de Tris-HCl pH=8,0. El EDTA secuestra el Ni<sup>2+</sup> de la columna y deshace la unión de his-Kis a la misma. Las proteínas Kid e his-Kis se replegaron mediante diálisis en tampón de plegado (0,5 M sulfato amónico, 50 mM acetato amónico, 20 mM β-mercaptoetanol, 0,1 mM EDTA y 5 % glicerol); se realizó un segundo paso de diálisis en tampones para cromatografía en SP- y Q-sefarosa en ausencia de glicerol (20 mM HEPES, 50-25 mM KCl, 5 mM β-mercaptoetanol y 0,1 mM EDTA), según fueran Kid o Kis. Seguidamente, las proteínas se sometieron a un segundo paso de purificación que consistió en una cromatografía de intercambio iónico SP- y Q-sefarosa. La elución de Kis o Kid se realizó mediante un gradiente salino de KCl, 25 - 500 mM ó 50 - 500 mM, respectivamente.

### **2.5.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Las proteínas fueron cuantificadas mediante espectrofotometría usando su coeficiente de extinción molar a 280 nm,  $\epsilon^{280}$ , calculado a partir de su composición de aminoácidos, Kid 5560 y Kis 7930 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### **2.5.3 MARCAJE FLUORESCENTE DE KID**

Las proteínas Kid silvestre y KidC74SC111, a la que le fue eliminado el residuo cisteína interno y colocado otro en el extremo amino-terminal, fueron marcadas con el fluoróforo Alexa 488 C<sub>5</sub> Maleimida (Invitrogen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. En primer lugar, Kid se dializó frente a tampón HEPES 20 mM. La proteína se utilizó a una concentración de 100 μM, se añadió el agente reductor TCEP (1 mM final), para evitar posibles puentes disulfuro que reduzcan la eficiencia de marcaje. El fluoróforo (1 mg) se disolvió en H<sub>2</sub>O, obteniéndose una concentración de 10 mM. El marcaje se realizó en una relación de moles de fluoróforo respecto a moles de proteína de 15:1. Mientras la muestra que contenía Kid



estaba en agitación suave, se fue añadiendo gota a gota el fluoróforo. La reacción de marcaje se prolongó durante 2 horas en un agitador orbital. Seguidamente, la muestra se dializó a 4 °C con tampón de dilución de proteínas durante 4 horas. Posteriormente, se prosiguió el cambio de tampón de la muestra para eliminar el fluoróforo no incorporado, usando unidades de filtración *Ultrafree®* de Millipore. Al calcular la concentración de la proteína se corrigió la absorbancia a 280 nm obtenida con el factor de corrección 0,11 (contribución del fluoróforo a dicha medida de absorbancia).

## 2.6 Técnicas de marcaje radioactivo.

### 2.6.1 MARCAJE RADIOACTIVO DE ARN EN EL EXTREMO 5'

Este marcaje se llevó a cabo mediante fosforilación con la T4 polinucleótido quinasa, empleando como donador de grupos fosfato el nucleótido marcado radiactivamente [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP. Se utilizaron 2  $\mu\text{l}$  del isótopo (20  $\mu\text{Ci}$ ) por reacción, para un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  y, aproximadamente, 50 pmoles de ARN (CopA, CopT ó TAR) que había sido previamente defosforilado. La purificación del ARN marcado radiactivamente se realizó mediante electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida, tal y como se explica en el apartado de **Métodos 2.4**.

### 2.6.2 MARCAJE RADIOACTIVO DE PROTEÍNAS *IN VITRO*

#### ✓ Ensayo de síntesis de proteínas en extractos de *E. coli*

Se utilizó el sistema *E. coli* S30 Extract System for Circular ADN (Promega). En el ensayo se monitoriza la síntesis de la proteína Luciferasa codificada en el plásmido pBESTLuc. La mezcla de reacción, 10  $\mu\text{l}$ , se preparó según las instrucciones del fabricante conteniendo: 1  $\mu\text{l}$  de mezcla de aminoácidos (excepto metionina) 1mM, 4  $\mu\text{l}$  de solución de reacción (*S30 Premix Without Amino Acids*), 3  $\mu\text{l}$  de extracto de *E. coli* tipo S30, 1  $\mu\text{l}$  de ADN pBESTLuc (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y 0,2  $\mu\text{l}$  de  $^{35}\text{S}$  met/cys a 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ . Se añadió 1  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía las proteínas 10 veces más concentradas que la concentración final deseada (0,6; 0,3; 0,15 ó 0,075  $\mu\text{M}$ ). Se incluyeron dos controles, uno positivo que contenía 1  $\mu\text{l}$  de tampón de dilución, y otro negativo que llevaba el inhibidor de síntesis de proteínas cloranfenicol a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 37 °C y, posteriormente, se pararon introduciendo los tubos en hielo y añadiendo 5  $\mu\text{l}$  de solución de carga de proteínas (5X). Tras desnaturizar las muestras 3 minutos a 95 °C, se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12,5 %. Tras la separación electroforética y el secado del gel, las proteínas marcadas fueron detectadas por autorradiografía.

#### ✓ Ensayo de síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo

Para el marcaje radioactivo de proteínas *in vitro* en eucariotas, se utilizó el sistema *Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el ensayo se monitoriza la síntesis de Luciferasa a partir de un ARNm molde. La mezcla de



reacción para 10 muestras se preparó añadiendo 70  $\mu$ l de *Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate*, 2  $\mu$ l de mezcla de aminoácidos 1 mM sin metionina, 4  $\mu$ l de  $^{35}\text{S}$  met/cys, 3  $\mu$ l de KCl 2,5 M, 2  $\mu$ l de *RNAasin* (Promega) y 4  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC 0,001 %. A 8,5  $\mu$ l de la mezcla de reacción se les añadió 1,5  $\mu$ l de tampón de dilución (en el control negativo). Al resto de las alícuotas de 8,5  $\mu$ l se les añadió 0,5  $\mu$ l de ARNm de Luciferasa (ARN luc) comercial (1mg/ml) y 1  $\mu$ l de tampón de dilución (en el control positivo) o 1  $\mu$ l de proteína 10 veces más concentrada que la concentración final deseada (0,3  $\mu$ M) en tampón de dilución. Las muestras se incubaron durante 90 minutos a 30 °C. Para parar la reacción de síntesis de proteínas, dichas muestras se introdujeron en hielo y se les añadió 5  $\mu$ l de solución de carga de proteínas (5X). Tras desnaturalizar las muestras durante 3 minutos a 95 °C, se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12,5 %. Tras la separación electroforética y el secado del gel las proteínas marcadas fueron detectadas por autorradiografía.

### 2.6.1 MARCAJE RADIOACTIVO DE PROTEÍNAS *IN VIVO*

Para el marcaje de proteínas totales sintetizadas *de novo* en *E. coli in vivo* se utilizó el isótopo  $^{35}\text{S}$  met-cys. Se utilizaron cultivos de *E. coli* inducidos con arabinosa o con IPTG en función del vector de expresión elegido (**ver Resultados**). Tras la inducción de los cultivos, con IPTG (100  $\mu$ M) y/o arabinosa (0,5 %), se tomaron alícuotas de 1 ml ( $A_{600} = 0,1$ ) a tiempo 0 y 60 minutos después de añadir el inductor. Se añadieron 10  $\mu$ Ci de  $^{35}\text{S}$  met/cys (1  $\mu$ l) a 1 ml de cultivo y se incubó 2 minutos a 37 °C. Seguidamente, se añadió 1 mg de metionina fría para competir con la incorporación de la marca, incubándose otros 8 minutos a la misma temperatura. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4 °C durante 2 minutos, a 20000 g. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con una solución 3 mM KCl, 68 mM de NaCl, 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 9 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en 20  $\mu$ l de solución de carga de proteínas (5X) y tras la desnaturalización durante 3 minutos a 95 °C se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12,5 %. Tras la separación electroforética y el secado del gel las proteínas marcadas fueron detectadas por autorradiografía.

## 2.7 Reacciones de corte del ARN con Kid.

### 2.7.1 REACCIONES DE CORTE DE LOS TRANSCRITOS ARN EN EXTRACTOS DE *E. COLI*

Se utilizó el sistema *E. coli* S30 *Extract System for Circular DNA* (Promega). El ARN se marcó en su extremo 5' con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP según se describe en (Munoz-Gomez y col., 2004). El volumen de reacción de cada muestra fue de 40  $\mu$ l, conteniendo: 4  $\mu$ l de mezcla de aminoácidos sin metionina, 16  $\mu$ l de la solución de reacción (*S30 Premix Without Amino Acids*), 4  $\mu$ l de Metionina (1 mM), 12  $\mu$ l de extracto de *E. coli* tipo S30 y 2  $\mu$ l de ARN CopT marcado. Las reacciones se iniciaron al añadir 1  $\mu$ l de las proteínas 10 veces más concentradas que la concentración final deseada (0,3  $\mu$ M). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 75 segundos

para detectar productos de corte mayores, según el caso. Las reacciones se pararon mediante congelación de las muestras en nieve carbónica. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de fenolización y precipitación para extraer el ARN de CopT, que se resuspendió en 10 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC 0,001 %. Tras lo cual se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida al 4 %. Tras la separación electroforética y el secado del gel, las muestras de ARN radiactivo fueron detectadas por autorradiografía.

### 2.7.2 REACCIONES DE CORTE DE ARNs CopA, CopT Y TAR en solución.

Se utilizaron como sustratos los ARNs CopA, CopT y TAR obtenidos mediante transcripción *in vitro*, y marcados en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. Se utilizaron 1000 CPM de ARN marcado y diferentes concentraciones de Kid y de las proteínas mutantes. Se procedió de igual manera que en el trabajo descrito anteriormente (Munoz-Gomez y col., 2004). Los productos de reacción se resolvieron en geles de poliacrilamida al 4 %.

### 2.7.3 REACCIONES DE CORTE DE LOS ARN RIBOSÓMICOS EUCARIOTAS.

Para evaluar el corte del ARNr eucariota se utilizó el sistema *Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System* (Promega). El lisado de reticulocitos se mezcló con un tampón que contenía Tris 40 mM, KCl 40 mM y EDTA 10 mM pH 7,5 en una proporción 1,5:2. Tras centrifugar 5 minutos se recogió el sobrenadante. Dicho sobrenadante se mezcló con las cantidades adecuadas de Kid y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 250 µl de tampón (Tris 50 mM, SDS 0,5 % pH 7,4), y tras agitarse la mezcla con vortex se procedió a fenolizar y precipitar el ARNr. El ARNr precipitado se resuspendió en 10 µl SDS 0,5 %. Se cargaron 4 ml de la muestra en un gel de agarosa con formaldehído y se realizó una electroforesis a 80 V durante 60 minutos en tampón MOPS 1X. El gel se tiñó con Bromuro de Etidio (1,0 µg/µl) y el ARNr se visualizó mediante la emisión de fluorescencia del Bromuro de Etidio irradiado con luz UV.

## 2.8 Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa.

Para realizar estos ensayos se utilizó la estirpe MLM373 conteniendo el plásmido indicador pMLM132 y los plásmidos derivados de pAB24. Los cultivos se crecieron a 37 °C en LB hasta alcanzar la fase exponencial. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó en unidades Miller (Miller, 1972). Se obtuvieron tres valores independientes para cada cultivo ensayado y con ellos se calculó el valor medio y la desviación estándar.

## 2.9 Aislamiento de mutantes espontáneos no tóxicos de la proteína Kid.

Para el aislamiento de estos mutantes se utilizó la estirpe OV2 conteniendo los plásmidos pAB1120 (*kis74amb*, *kid*) o pAB17 (*kis18*, *kid*). La estirpe OV2 se caracteriza por la presencia del supresor termosensible *supFts* capaz de suprimir mutaciones ámbar a 30°C pero no a 42°C. Por

esta razón, a 42 °C OV2 conteniendo pAB1120 sintetiza una proteína Kis trunca da incapaz de neutralizar la toxicidad de la proteína Kid. El gen *kis18* contiene una mutación en la antitoxina que cambia la prolina en posición 18 por leucina, dando lugar a una proteína Kis termosensible. Los mutantes espontáneos que inactivan la toxicidad de Kid se seleccionaron como colonias capaces de crecer tanto a 30 °C como a 42 °C, en OV2 conteniendo pAB1120 o pAB17. Después de aislar los plásmidos de estas colonias y reintroducirlos en la estirpe OV2, se seleccionaron los transformantes a 30 °C y se evaluó su crecimiento a 42 °C. Los transformantes que mostraron un crecimiento normal a 42 °C cont enían en principio mutaciones en el sistema *parD* que inactivaban la toxicidad de Kid. Estas mutaciones se localizaron mediante secuenciación del operón *parD*.

## 2.10 Ensayos de Western Blot.

Los ensayos de *Western Blot* se llevaron a cabo tal y como se describió anteriormente (Diago-Navarro y col., 2009b) en cultivos inducidos para la toxina Kid o la antitoxina Kis. Los cultivos de *E. coli* se indujeron con arabinosa (1 %) o ácido nalidíxico (25 µg/ml) dependiendo del sistema de expresión utilizado (**ver Resultados**). Los extractos celulares se resolvieron en geles SDS-PAGE al 15 %. Seguidamente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad). Para la detección de las proteínas se utilizaron anticuerpos frente a Kid, Kis o DnaK, según conveniencia.

Cuando la membrana se utilizó para incubaciones con más de un anticuerpo, se procedió secuencialmente detectando primero una de las proteínas con el primer anticuerpo, lavando a continuación la membrana y detectando la siguiente proteína con el siguiente anticuerpo. El proceso de lavado se realizó tal y como se describe en el protocolo del Kit *ECL detection system* (Amersham Biosciences).

## 2.11 Ensayos de retardo en gel.

Los ensayos de retardo en gel se realizaron según se describe en (Monti y col., 2007). Se utilizó un fragmento de 174 pb que contenía la región promotora del sistema *parD* marcado en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. El ADN (2 nM) se incubó con una mezcla de Kis y Kid (4,8:2,4 µM) durante 1 hora a 4 °C, en tampón de unión. Posteriormente, las muestras se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 5 %, y el ADN se visualizó mediante exposición autorradiográfica.

## 2.12 Espectrometría de masas (EM).

Los efectos de mutaciones en Kid sobre la unión al ARN o en el corte del mismo, se evaluaron mediante espectrometría de masas (Sharon y Robinson, 2007, Heck, 2008). Los estudios de espectrometría de masas se llevaron a cabo en tampón MS. Para la detección de las interacciones de Kis:Kid:ADN se procedió según se describió anteriormente (Monti,

Hernandez-Arriaga y col. 2007) utilizando relaciones molares Kid:Kis que variaron desde 2:1 a 1:2, siendo 10  $\mu\text{M}$  la menor concentración de proteína utilizada en todos los casos. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante un minuto antes de ser sometidas a EM. En estos ensayos se utilizó un fragmento de ADN de 30 pb que contiene un palíndromo perfecto que incluye la región -10 del promotor *parD*. Dicho ADN se obtuvo por hibridación de los oligonucleótidos DownA y DownB. Se utilizó una relación Kis:Kid:ADN de 5:5:1, siendo la concentración del ADN de 3  $\mu\text{M}$ . Para monitorizar la unión de Kid al ARNI (5'-AdUACA-3') se utilizó una concentración de ambas moléculas de 15  $\mu\text{M}$ , mientras que para los ensayos de corte de ARN se utilizaron las proteínas a 0,2  $\mu\text{M}$  y el ARNII (5'-UUACU-3') a 50  $\mu\text{M}$ , o el ARNIII (5'-AUACA-3') a 50  $\mu\text{M}$  y las proteínas a 20  $\mu\text{M}$ .

Las muestras en solución se ionizaron mediante la técnica de nano-electrospray (*Z-spray*) como se indica en el siguiente párrafo utilizando capilares de alrededor de 5  $\mu\text{m}$ . Estos capilares se realizaron utilizando el instrumento *P-97 puller* (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA), a partir de cristal de borosilicato (*Kwik-Fil*, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA). Seguidamente, cada capilar fue recubierto con una fina capa de oro (~500 Å) utilizando el instrumento *Edwards ScanCoat Six Pirani 501 sputter coater* (Edwards High Vacuum International, Crawley, UK).

Los experimentos de espectrometría de masas nativa se realizaron tal y como se describe en (Monti y col., 2007), usando el espectrómetro de masas ESI-TOF, equipado con una fuente de ionización nano-electrospray (*Z-spray*) (*ElectroSpray Ionization orthogonal Time-Of-Flight*) (Micromass LC-T, Waters, Manchester, UK) modificado para operar con altas masas y en modo positivo (detección de moléculas cargadas positivamente) (van den Heuvel y col., 2006). El electrospray se inició aplicando un voltaje eléctrico de 1000-1300 V y una presión interna, en las primeras fases de vacío, de 7-9 mbar para enfriar los iones y conseguir grandes iones de complejos de proteína intactos. La presión en el cono fue de 30-60 V.

Para monitorizar la rotura del ARNII por las diferentes proteínas Kid se acopló al espectrómetro LC-T una fuente de ionización ESI robotizada basada en un chip (Nanomate, Advion Biosciences). La fuente se programó para aspirar un volumen de 2  $\mu\text{l}$  de muestra y llevar la muestra a una punta conductora que, posteriormente, conduce la muestra al chip ESI. El chip consiste en 10 x 10 inyectores en una superficie de silicio y un canal que se extiende hasta la cara interna del chip. El electro-spray se consiguió aplicando un voltaje de 1800-1900 V y una presión de 0,3 psi a la muestra en la punta conductora, y un voltaje de 30 V en el cono. Las muestras fueron medidas con un tiempo de escaneo de 2 segundos hasta completar un total de 10 minutos por muestra.

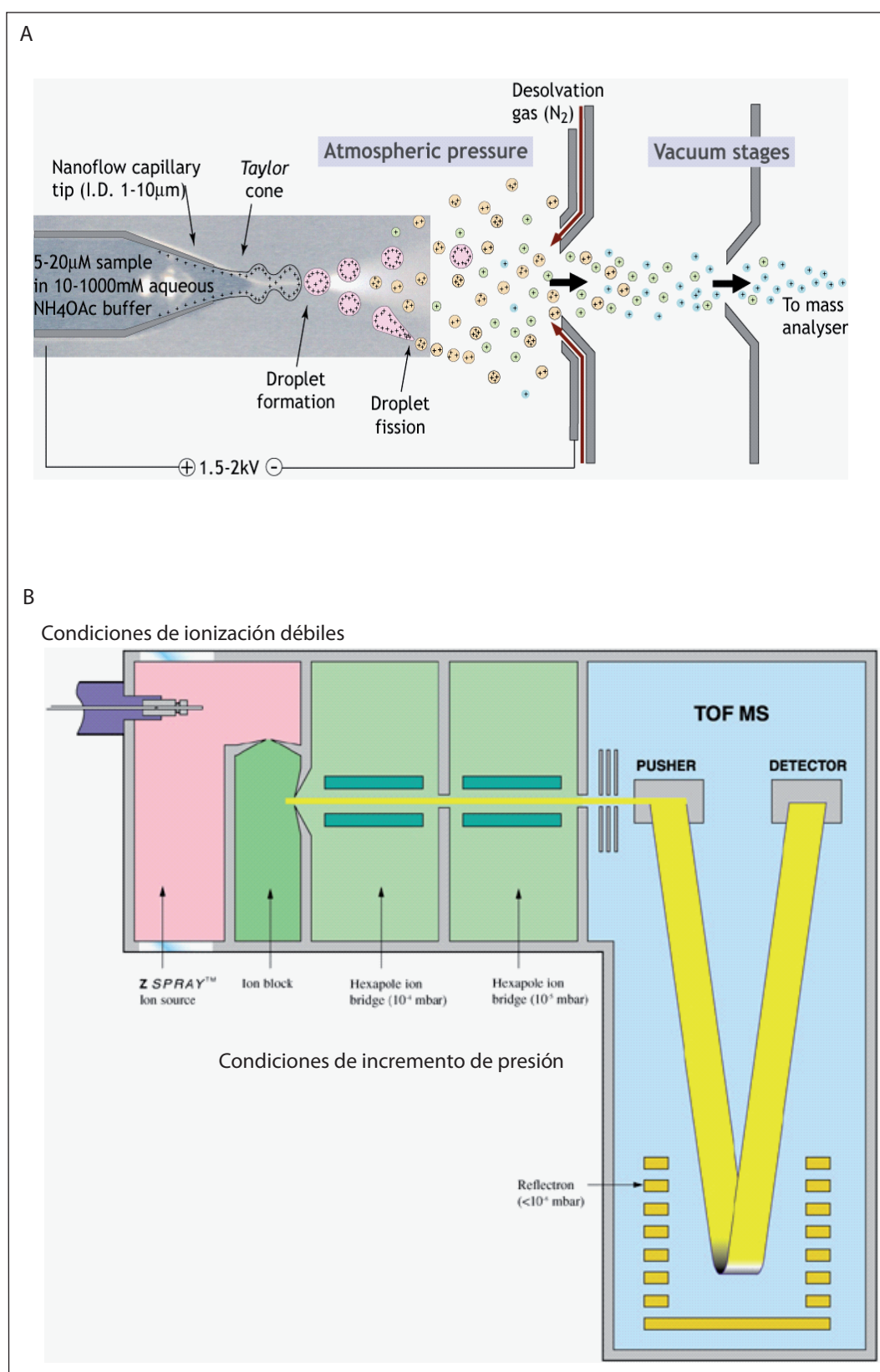


Figura 9.- Esquema de la ionización (A) y análisis y detección de las muestras en la espectrometría de masas ESI-TOF (B).



### 2.13 Análisis de los datos de espectrometría de masas.

Los datos de EM obtenidos para la proteína Kid silvestre y para las diferentes proteínas mutantes fueron semi-cuantificados para determinar el porcentaje de unión relativo de dímeros de Kid a una molécula del ARNI (AdUACA). Usando el programa MassLynx 4.0 (Waters) los datos fueron acumulados durante 2 minutos, se promediaron, suavizaron, centraron y se integró el área de los picos para obtener los valores de intensidad de cada especie iónica presente. La intensidad total de la proteína presente en la muestra fue calculada sumando la intensidad de todas las especies iónicas pertenecientes a la envoltura Gaussiana del estado de cargas, tanto de la proteína unida como de la no unida. La cantidad de proteína unida fue calculada sumando la intensidad de todas las especies iónicas distribuidas en la envoltura Gaussiana de cargas. El porcentaje de proteína unida al ARNI se calculó como la relación entre el valor de la intensidad de la proteína unida y la proteína total presente en la muestra. El porcentaje relativo de unión se basó en tres medidas independientes, dándose como valor de error su desviación estándar.

La semi-cuantificación de los productos de ARN (UU y ACU), tras el corte por las proteínas Kid, se realizó en diferentes experimentos. Se acumularon 10 minutos de adquisición de datos en grupos de 30 ó 60 segundos, se promediaron, suavizaron y centraron, utilizándose el programa MassLynx 4.0 (Waters). La intensidad de los iones para cada producto de corte fue calculada sumando la intensidad de todas las especies iónicas pertenecientes a la envoltura del estado de carga Gaussiana de los productos bajo análisis. Este valor se sumó al obtenido para el ARN no procesado, obteniéndose la intensidad de todo el ARN presente en la medida. La cantidad del ARN total y de los productos de corte se basó en tres medidas independientes, calculándose su desviación estándar.

### 2.14 Análisis estadístico de los datos.

Los datos de unión, obtenidos según el apartado 2.13 de esta sección, de las proteínas Kid silvestre y mutantes al ARNI, se trataron estadísticamente para comprobar si existían diferencias significativas en la unión al ARN sustrato. En primer lugar se utilizó el estadístico de Levene para aceptar la igualdad de varianza de los datos, seguidamente, se aplicó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el de Bonferroni para evaluar la significación estadística de los datos a un nivel de significancia del 95 %.

### 2.15 Ensayos de toxicidad.

Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo evaluando el efecto que produce la expresión de los genes *kid*, *kid* mutantes, *kis*, *relE*, *relB*, *prfA* o la presencia de diferentes tipos de antibióticos, sobre el crecimiento y la viabilidad de las estirpes ensayadas. Para ello, cultivos celulares crecidos durante 14 horas fueron diluidos 1:100 en medio fresco LBT, con el antibiótico específico para cada vector de expresión, permitiendo su crecimiento hasta

llegar a fase exponencial,  $A_{600} \sim 0,3-0,4$ . A continuación, se hicieron diluciones seriadas de los cultivos. Se sembraron 7  $\mu$ l, tanto de los cultivos sin diluir como de las diluciones seriadas, en placas con los antibióticos e inductores apropiados en cada tipo de ensayo. Las placas fueron incubadas a 30, 37 o 42 °C, según las estirpes utilizadas, durante 16-20 horas. Este método permite una evaluación semi-cuantitativa de los niveles relativos de toxicidad, derivados del factor de dilución para el cuál se obtiene el mismo número de colonias en dos puntos, además de los efectos observables en el crecimiento de las muestras correspondientes a las distintas diluciones.

## 2.16 Ensayos de complementación.

Los ensayos de complementación se llevaron a cabo en la cepa MRA8 que contiene una mutación termosensible (*prfA1ts*) en el gen cromosómico *prfA* que codifica el factor de terminación de la traducción RF1. Dicha cepa fue transformada con los plásmidos derivados de pBAD18 (pELI01, pELI02, pELI03 y pELI04) que contienen las diferentes variantes del gen *prfA* (*prfA121*, *prfAwt*, *prfA301* y *prfA304*). Estas estirpes fueron crecidas durante la noche a 30 °C antes de ser diluidas 1:100 en medio fresco LBT con ampicilina 100  $\mu$ g/ml, en presencia o ausencia de arabinosa (0,2 % final), inductor de la expresión de las proteínas RF1 silvestre y mutantes. Los cultivos se transfirieron a 42 °C para expresar el fenotipo mutante del gen *prfA1ts* y se siguió su  $A_{600}$  cada 20 minutos durante 160 minutos.

## 2.17 Dicroísmo Circular (DC).

Los estudios de dicroísmo circular (Schmid, 1997) se realizaron en un espectropolarímetro Jasco-720, tal y como se describió anteriormente (Santos-Sierra y col., 2003). Se utilizaron 200  $\mu$ l de proteína a una concentración entre 10-15  $\mu$ M, en 100 mM de tampón  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH 7,0. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de un paso óptico.

Los espectros de DC fueron adquiridos a 5 °C a longitudes de onda entre 195 y 260 nm (incrementos de 0,2 nm, velocidad de barrido 20 nm/minuto y una constante de tiempo de 4 segundos). Se promediaron 5 espectros por cada muestra y se restó el espectro del tampón como blanco. Las medidas de elipticidad (en milésimas de grado) se representaron usando el programa SigmaPlot 9.0.

La estabilidad térmica de las proteínas fue evaluada mediante experimentos de desnaturalización térmica (Pace y Scholtz, 1997). Para evitar posibles evaporaciones de la muestra por el proceso de calentamiento, éstas fueron previamente cubiertas con dos gotas de aceite mineral. La temperatura de la célula se incrementó de 5 a 90 °C a una velocidad de 20 °C por hora, recogiendo datos de elipticidad a una longitud de onda de 220 nm, máxima señal para las  $\alpha$ -hélices. Se representaron los datos como elipticidad (en milésimas de grado) frente a la temperatura.

El contenido de estructuras secundarias fue estimado, una vez transformados los datos, como la elipticidad molar promedio  $[\Theta]_{\text{MRW220}}$  (deg cm<sup>2</sup>/dmol) con el programa SOMCD (<http://geneura.ugr.es/cgi-bin/somcd/som.cgi?start=1>).

### 2.18 Obtención de perfiles ribosomales.

Los perfiles ribosomales se obtuvieron según el método descrito anteriormente con ligeras modificaciones (Prysak y col., 2009). Los cultivos de *E. coli* crecidos durante toda una noche se diluyeron 1/100 en 50 ml de medio LBT fresco, dejándose crecer hasta una  $A_{600} \sim 0,4$ . Posteriormente, se añadió el inductor de la expresión del promotor de la toxina Kid, arabinosa 0,5 % final. Se dejaron crecer los cultivos durante 90 minutos más, tras los cuales se recolectaron las células durante 10 minutos a 7000 rpm. Las células se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  del tampón de perfil de ribosomas (RPB). Se añadieron 20 unidades de  $A_{260}$  sobre tubos conteniendo 12 ml de un gradiente de sacarosa del 5 al 40% y centrifugándose a 39000 rpm, durante 135 minutos en un rotor tipo SW 40. Los gradientes se fraccionaron en el equipo *Absorbance/Fluorescence Monitor UA-5* y *Density Gradient Fractionator 185* (Teledyne ISCO) y se recolectaron 20 fracciones de 500  $\mu\text{l}$ .

### 2.19 Espectrofluorimetría.

Las medidas de emisión de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Fluorolog-3-221 (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, Francia). Se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia a 25 °C, usando la longitud de onda de excitación máxima correspondiente a cada fluoróforo: 513 nm para la proteína EYFP y 488 nm para el fluoróforo Alexa 488. Los valores de intensidad de fluorescencia se normalizaron por los valores de intensidad de la lámpara.





## VI. RESULTADOS



## 1 EVALUACIÓN DEL MODELO DE UNIÓN Y CORTE DEL ARN POR LA TOXINA KID

### 1.1 Obtención de proteínas Kid mutantes.

El modelo disponible sobre la interacción de Kid con el ARN y sobre el mecanismo de rotura de este sustrato indica que los aminoácidos T46, S47, A55, F57, T69, V71 y R73 participan en la unión específica con el ARN, y que los residuos D75, R73 y H17 forman parte del centro catalítico de la toxina. Los residuos D75 y R73 actúan como la base y el ácido catalíticos respectivamente, mientras que el residuo H17 se supone que juega un papel importante en la estabilización de intermedios de la reacción (Kamphuis y col., 2006). Se espera que mutaciones que afecten a estos residuos puedan tener un efecto diferencial en la unión y/o en la rotura del ARN y en la toxicidad de Kid.

Se disponía de una serie de mutantes no tóxicos que fueron inducidos mediante mutagénesis *in vitro* con hidroxilamina (Santos-Sierra y col., 2003) y que estaban parcialmente caracterizados. La colección incluía cambios en residuos catalíticos (R73H y D75N), pero no en el residuo estabilizador H17, ni tampoco en los residuos implicados en la especificidad de unión al ARN. Ya que la hidroxilamina favorece transiciones GC-AT que podrían limitar el rango de mutantes obtenibles, procedimos, en primer lugar, a aislar una nueva colección de mutantes no tóxicos espontáneos, procedimiento que, en principio, puede introducir cualquier cambio que inactive a la toxina, y en una segunda instancia, a completar la colección de mutantes en los residuos clave mediante mutagénesis dirigida.

#### 1.1.1 GENERACIÓN DE MUTANTES ESPONTÁNEOS

La estirpe OV2 (*supF (ts)*) transformada con los plásmidos pAB17 o pAB1120 fue utilizada para el aislamiento de mutantes no tóxicos en la proteína Kid que se seleccionaron por su capacidad de conferir a las colonias la capacidad de crecer a 42 °C (**Materiales y Métodos 2.9**). Ambos plásmidos llevan el operón *parD (kis, kid)* en el que el gen de la antitoxina *kis* posee mutaciones que a 42 °C le hacen incapaz de neutralizar a la toxina Kid. El plásmido pAB17 posee la mutación puntual *kis18* (P17L) que inactiva la proteína Kis a 42 °C, mientras que pAB1120 posee la mutación *kis74* que introduce un codón de terminación ámbar en el codón 74 que trunca e inactiva esta antitoxina; a 30 °C, pero no a 42 °C, el supresor F termosensible de OV2 es capaz de suprimir la mutación ámbar y de restaurar la actividad de la antitoxina. Mediante esta aproximación, se obtuvieron una serie de mutantes que se muestran en la **tabla 5** y que se representan en contexto de la secuencia aminoacídica de la proteína en la **figura 10**. Se aislaron las mutaciones D75E y D75N en el residuo D75 que había sido propuesto como parte del centro activo de la proteína. La mutación D75N se había aislado previamente mediante tratamiento con hidroxilamina. No se encontraron mutaciones en el residuo R73, anteriormente aislados en el tratamiento con hidroxilamina (Santos-Sierra y col., 2003), indicando que la muestra analizada, aunque alta (170 mutantes analizados) no fue suficiente. Tampoco se obtuvieron

## Resultados

mutantes en el residuo estabilizador H17, probablemente por la misma razón. Asimismo, no aparecieron en esta búsqueda mutantes puntuales en ninguno de los residuos implicados en la unión específica al ARN como ya ocurrió en la muestra tratada con hidroxilamina. Ya que se han identificado sobre la estructura Kid-ARN seis de estos residuos, es probable que se necesite al menos cambios en dos de estos residuos para ver un efecto en la toxicidad. Por otra parte, se encontraron nuevos mutantes puntuales no tóxicos afectados en los residuos: E5, I6, L26, T37, V42, D75, R78, D81, L102, L105 y S106 siendo los más frecuentes los que afectaban a los residuos E5 y D75. En el residuo E5 se encontraron cambios por glicina, valina y aspártico. Se eligió para un estudio más detallado la mutación E5G por ser la que aparecía con una mayor frecuencia.

Tabla 5.- Mutantes espontáneos que inactivan la toxicidad de Kid encontrados en los plásmidos pAB1120 y pAB17.

Tipo de plásmido	Número de mutante	Tipo de mutación	Cambio de aminoácido introducido
pAB1120	3	Sustitución nucleótido en posición 316 (TCC-CCC) en <i>kid</i>	Ser106 a Pro
pAB1120	14	Delección 20 nucleótidos en <i>kid</i> (del 97 al 117)	*
pAB1120	17	Delección >100 nucleótidos en plásmido	*
pAB1120	20	Sustitución nucleótido en posición 14 en <i>kid</i> (GAA-GTA)	Glu5 a Val
pAB1120	34	Sin mutaciones en <i>kid</i> , <i>kis</i> o en el promotor	?
pAB1120	35	Sustitución en <i>kis74</i> (TAG-TTG)	STOP74 a Leu
pAB1120	36	Sustitución en <i>kis74</i> (TAG-TTG)	STOP74 a Leu
pAB17	79	Delección >100 nucleótidos en plásmido	*
pAB17	80	Sustitución en <i>kid</i> en posición 77 (GAT-GAA)	Asp75 a Glu
pAB17	81	Delección en <i>kid</i> entre nucleótidos 124 u 146 en <i>kid</i>	*
pAB17	82	Sustitución nucleótido en posición 21 (TGG-TGA) + nucleótido en posición 296 (AAC-AGC) en <i>kid</i>	Trp7 a STOP Asn99 a Ser
pAB17	83	Sustitución nucleótido 14 en posición (GAA-GGA) en <i>kid</i>	Glu5 a Gly

pAB17	84	Delección >100 nucleótidos en el plásmido	*
pAB17	86	Sustitución nucleótido 14 en posición (GAA-GTA) en <i>kid</i>	Glu5 a Val
pAB17	87	Delección >100 nucleótidos en el plásmido	*
pAB17	88	Delección >100 nucleótidos en el plásmido	*
pAB17	89	Delección nucleótido en posición 228 en <i>kid</i>	En R85 cambio de ORF
pAB17	90	Delección 10 nucleótidos (del 23 al 33) en <i>kid</i>	Sin proteína Kid
pAB17	91	Sustitución nucleótido en posición 77 (CTG-CAG)	Leu26 a Gln
pAB17	92	Delección >100 nucleótidos en plásmido	*
pAB17	94	Sustitución nucleótido en posición 14 (GAA-GGA)	Glu5 a Gly
pAB17	95	Sustitución nucleótido en posición 305 (CTT-CCT)	Leu102 a Pro
pAB17	98	Delección (nucleótido en posición 249 de <i>kis</i> al 11 de <i>kid</i> )	Sin proteína
pAB17	99	Sustitución nucleótido en posición 17 (ATC-AAC) en <i>kid</i>	Ile6 a Asn
pAB17	102	Delección de 83 nucleótidos en <i>kid</i>	*
pAB17	103	Sustitución nucleótido en posición 124 (GTT-TTT) en <i>kid</i>	Val42 a Phe
pAB17	104	Delección >100 nucleótidos en plásmido	*
pAB17	105	Sustitución nucleótido en posición 313 (CTG-GTG) en <i>kid</i>	Leu105 a Val
pAB17	106	Delección >100 nucleótidos en plásmido	*
pAB17	107	Sustitución nucleótido en posición 224 (ATC-AAC) de <i>kid</i>	Asp75 a Glu
pAB17	108	Delección del nucleótido en posición 13 en <i>kid</i>	Cambio de ORF
pAB17	111	Inserción de 1 nucleótido tras el 13	Cambio de ORF
pAB17	112	Sustitución nucleótido en posición 14 (GAA-GGA) en <i>kid</i>	Glu5 a Gly
pAB17	113	Sustitución nucleótido en posición 52 (CAG-TAG) en <i>kid</i>	Gln19 a STOP
pAB17	114	Sustitución nucleótido en posición 109 (ACC-CCC) en <i>kid</i>	Thr37 a Pro

## Resultados

pAB17	115	Delección de los últimos 10 nucleótidos de <i>kid</i>	Proteína incompleta
pAB17	117	Sustitución nucleótido en posición 240 (GAT-GGT) en <i>kid</i>	Asp81 a Gly
pAB17	118	Repetición de 11 nucleótidos de los nucleótidos 4 al 15 en <i>kid</i>	Cambio de ORF
pAB17	119	Inserción de un nucleótido en posición <i>kid</i> 300	Cambio de ORF
pAB17	121	Inserción de un nucleótido en posición <i>kid</i> 300	Cambio de ORF
pAB17	123	Sustitución nucleótido en posición 109 (ACC-CCC) en <i>kid</i>	Thr37 a Pro
pAB17	124	Inserción de 1 nucleótido tras el 13 en <i>kid</i>	Cambio de ORF
pAB17	125	Inserción de 20 nucleótidos a partir del 133 en <i>kid</i>	Cambio ORF
pAB17	126	Sustitución nucleótido en posición 77 (GAT-GAA) en <i>kid</i>	Asp75 a Glu
pAB17	128	Sustitución nucleótido en posición 15 (GAA-GAC) en <i>kid</i>	Glu5 a Asp
pAB17	129	Sustitución nucleótido en posición 232 (CGG-TGG) en <i>kid</i>	Arg78 a Trp
pAB17	131	Sustitución nucleótido en posición 16 (GAA-GGA) en <i>kid</i>	Glu5 a Gly
pAB17	134	Inserción de un nucleótido en posición <i>kid</i> 300	Cambio ORF
pAB17	137	Sustitución nucleótido en posición 16 (GAA-GGA) en <i>kid</i>	Glu5 a Gly
pAB17	139	Sustitución nucleótido en posición 76 (GAT-GGT) en <i>kid</i>	Asp75 a Gly
pAB17	140	Inserción de un nucleótido en posición <i>kid</i> 300	Cambio de ORF
pAB17	147	Sustitución nucleótido en posición 16 (GAA-GGA) en <i>kid</i>	Glu5 a Gly

\* La mutación deleciona o trunca el gen de la proteína Kid.

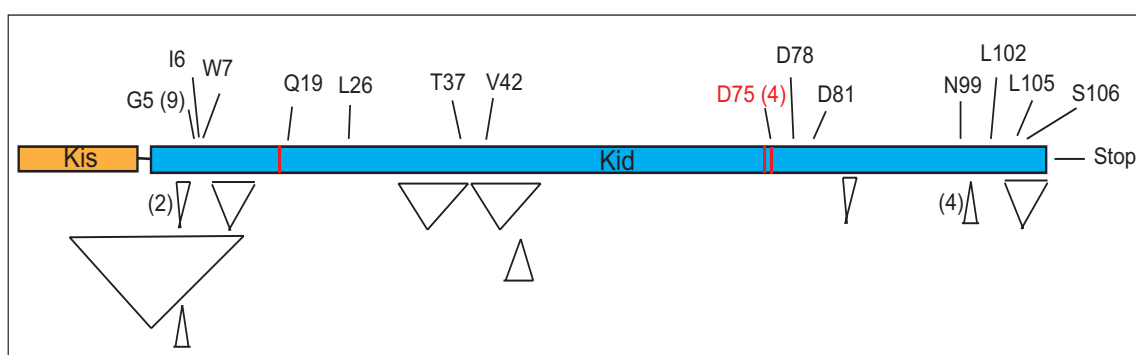


Figura 10.- Esquema de la localización de las mutaciones encontradas en los genes *kis* y *kid*. Las letras y números representan los residuos afectados por cambios puntuales. Δ indica un lugar donde se ha producido una inserción de nucleótidos, ▽ indica un lugar donde se ha producido una deleción de nucleótidos. El tamaño de los triángulos es indicativo del tamaño, en nucleótidos, de la inserción o deleción. Entre paréntesis se muestra el número de veces que el cambio se ha producido en la colección de mutantes obtenidos.

### 1.1.2 OBTENCIÓN DE MUTANTES POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Al no aparecer mutaciones espontáneas o inducidas con hidroxilamina en los residuos T46, A55 y T69, implicados en la interacción específica con el ARN, o en el residuo catalítico H17, se obtuvieron mutantes en estos residuos mediante mutagénesis dirigida, según se indica en **Materiales y Métodos 1.5**. Los cambios introducidos se verificaron mediante secuenciación del ADN. Los residuos T46, A55 y T69 son los únicos residuos que contribuyen a la especificidad de unión formando puentes de hidrógeno con las bases del sitio de reconocimiento en el ARN. Se optó por cambiar estos residuos por glicina ya que dicho cambio impedirá la formación del puente de hidrógeno, y es compatible con la estructura de lazo en la que tanto T46, como A55 y T69 están localizados. Para explorar posibles sinergias o efectos aditivos se construyeron los mutantes dobles T46G/T69G y A55G/T69G. H17 participa en el centro activo de Kid estabilizando, a través de un puente de hidrógeno con el O1P de la adenosina, el intermedio de reacción pentavalente formado tras el ataque nucleofílico que sucede en la reacción de corte. En la mutagénesis se substituyó la histidina por prolina, ya que este residuo impide la formación del puente de hidrógeno con la adenosina del ARN.

### 1.1.3 SOBREPRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MUTANTES

Las mutaciones elegidas Kid D75E, D75N, H17P, R73H (residuos del centro catalítico), T46G, A55G, T69G y los dobles mutantes T46G/T69G y A55G/T69G (residuos de especificidad de unión a ARN) fueron introducidas en el plásmido pRG-his-KisKid para facilitar la sobreproducción de las toxinas mutantes y proceder a su posterior purificación. Se disponía, a su vez, del sobreproductor pRG-his-KisKidR85W que introducía un cambio en Kid que afecta a una región importante de unión a ARN. También se eligió el mutante E5G que aparecía con alta frecuencia en la búsqueda de mutantes no tóxicos espontáneos.



## 1.2 Análisis de la estabilidad y de la estructura de las proteínas mutantes.

Se realizaron ensayos de *Western Blot* para comprobar si alguna de las mutaciones inestabilizaba la toxina. Se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE de los lisados celulares de TG1 con los diferentes plásmidos pRG-his-KisKid en condiciones de inducción; las proteínas, tras ser transferidas a una membrana PVDF, se detectaron mediante inmunodetección con un suero policlonal anti-Kid, anti-Kis o anti-DnaK. Los niveles de proteína Kis y DnaK se utilizaron como control de expresión y de carga de proteína total respectivamente. La **figura 11A** muestra los resultados de la inmunodetección de las proteínas Kid mutantes, de Kis y de DnaK. La cantidad de lisado cargado fue similar en las distintas muestras como demuestra la cantidad de DnaK detectada en cada caso. La mutación E5G produce una toxina inestable ya que se detecta una mínima cantidad de KidE5G, mientras que los niveles de la antitoxina Kis permanecen normales. El fenotipo no tóxico de este mutante podría deberse a los bajos niveles de proteína Kid presentes. Por esta razón, la proteína mutante KidE5G no se purificó ni se incluyó en estudios posteriores. La detección de KidR73H es menor en comparación con la proteína silvestre al igual que sucede con Kis y puesto que la carga de DnaK es similar en todas las calles, la menor presencia de ambas proteínas podría deberse a una menor inducción del sobreproductor.

Las proteínas purificadas KidD75E, KidD75N, KidH17P, KidR73H, KidA55G, KidT69G, KidR85W fueron analizadas por dicróismo circular, espectroscopía que permite obtener información global sobre los elementos de estructura de la proteína. El análisis mostró que el patrón general de los espectros de los mutantes no difería mucho del obtenido para la proteína silvestre (**Figura 11B**). La deconvolución de los espectros usando el programa SOMCD indica que no existen diferencias en el contenido del componente  $\beta$ -lámina, característico de esta proteína, entre las proteínas Kid silvestre, KidH17P y KidA55G (37,9 % para todas). El mutante KidT69G muestra una pequeña diferencia (35,8 %) mientras que la diferencia es mayor con los mutantes KidD75N, KidD75E, KidR73H y KidE91K (41,7 %). Estas variaciones ocurren a expensas tanto de los componentes de  $\alpha$ -hélice como inespecíficos. Estos datos sugieren que las proteínas comparten un patrón de plegamiento similar (ver también análisis funcionales posteriores).

Posteriormente, se comparó la estabilidad térmica de las proteínas mutantes con la proteína silvestre mediante el estudio de los perfiles de desnaturalización. Se determinó la  $T_m$ , temperatura a la cual el 50% de las moléculas se encuentran desnaturalizadas, de cada una de las proteínas caracterizadas. El análisis indicó diferencias claras en los valores de temperatura de desnaturalización obtenidos, dependiendo de la proteína analizada (**Figura 11C**). Las proteínas con mayores diferencias en la  $T_m$  con respecto a la proteína silvestre (71 °C), son KidD75N y KidD75E (58 °C y 63,5 °C), y KidH17P y KidR73H (65 °C). Todas ellas llevan mutaciones que afectan a residuos del centro activo y presentaron una  $T_m$  menor que la obtenida para la proteína silvestre. Las mutaciones que influyeron en menor medida en

las T<sub>m</sub>, son aquellas que afectan a residuos que en principio intervienen en la unión al ARN sustrato o que confieren especificidad a esta unión y que se localizan hacia la superficie de la proteína. Así, KidA55G tiene el valor de T<sub>m</sub> más parecido al de la proteína silvestre (70 °C), mientras que el valor de T<sub>m</sub> fue ligeramente menor en el caso de las proteínas KidR85W y KidT69G (68,8 °C).

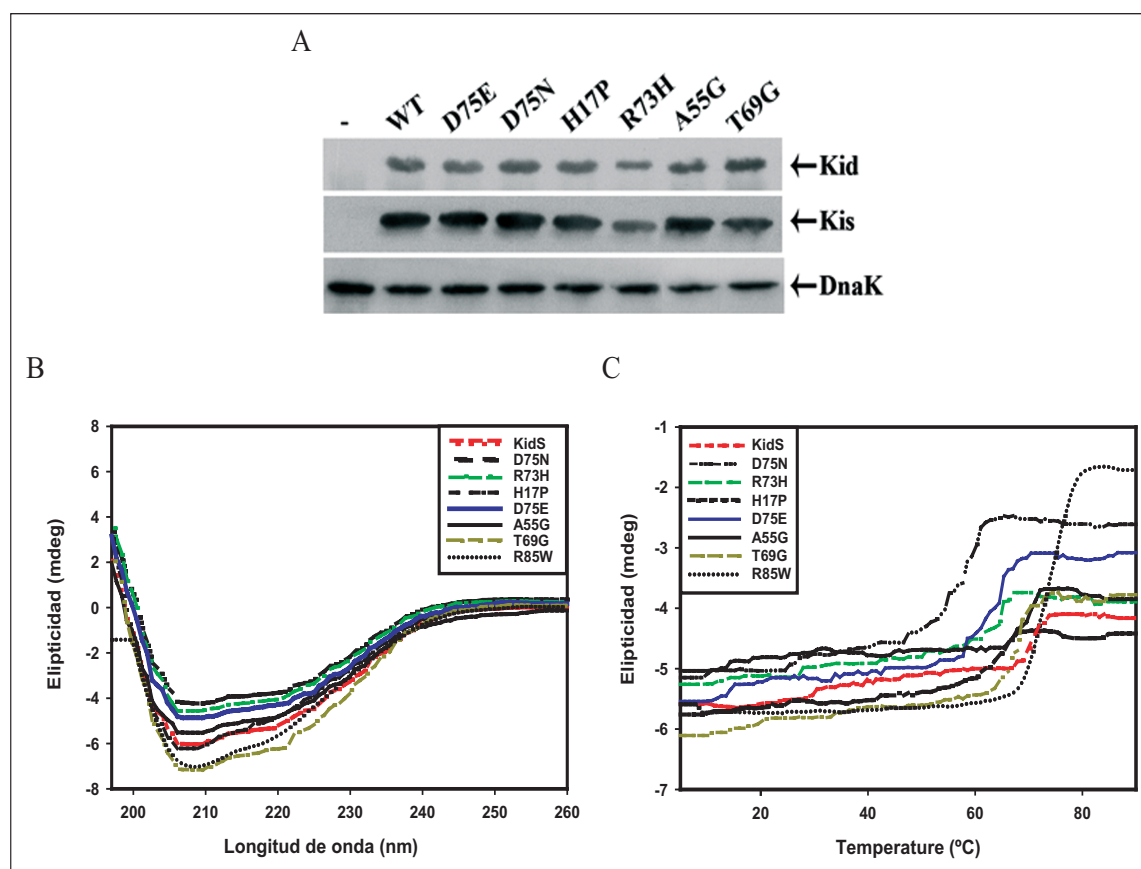


Figura 11.- Niveles intracelulares y perfiles de dicroísmo circular (DC) de los diferentes mutantes. A) Inmunodetección de las proteínas Kid, Kis y DnaK en extractos de la cepa de *E. coli* TG1 conteniendo los plásmidos derivados de pRG-his-KisKid (proteína Kid silvestre o mutantes). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se detectaron con anticuerpos policlonales. Tras detectar la primera proteína (Kid), la membrana se trató para ser de nuevo incubada con los anticuerpos anti-Kis y anti-DnaK. En B) y C) se muestra el análisis de la estructura y estabilidad térmica mediante dicroísmo circular (DC). B) se muestra el espectro de elipticidad en el ultravioleta lejano para las proteínas Kid silvestre (S) y mutantes; C) se muestra el perfil de desnaturalización térmica de las proteínas evaluadas detectando el cambio a 220 nm en el rango de temperaturas ensayadas.

### 1.3 Las mutaciones introducidas en la toxina no afectan la capacidad de formar complejos con la antitoxina.

Mediante EM nativa se comprobó la capacidad de las proteínas Kid mutantes de interaccionar con la antitoxina Kis. Se ensayaron diferentes relaciones de Kid:Kis (2:1, 1:1, 1:2), ya que según se había determinado, Kid y Kis pueden formar complejos con diferente estequiometría de unión (Kamphuis y col., 2007, Monti y col., 2007) (**ver Materiales y Métodos 2.12**). La estequiometría de unión de los complejos obtenidos indica que las proteínas Kid

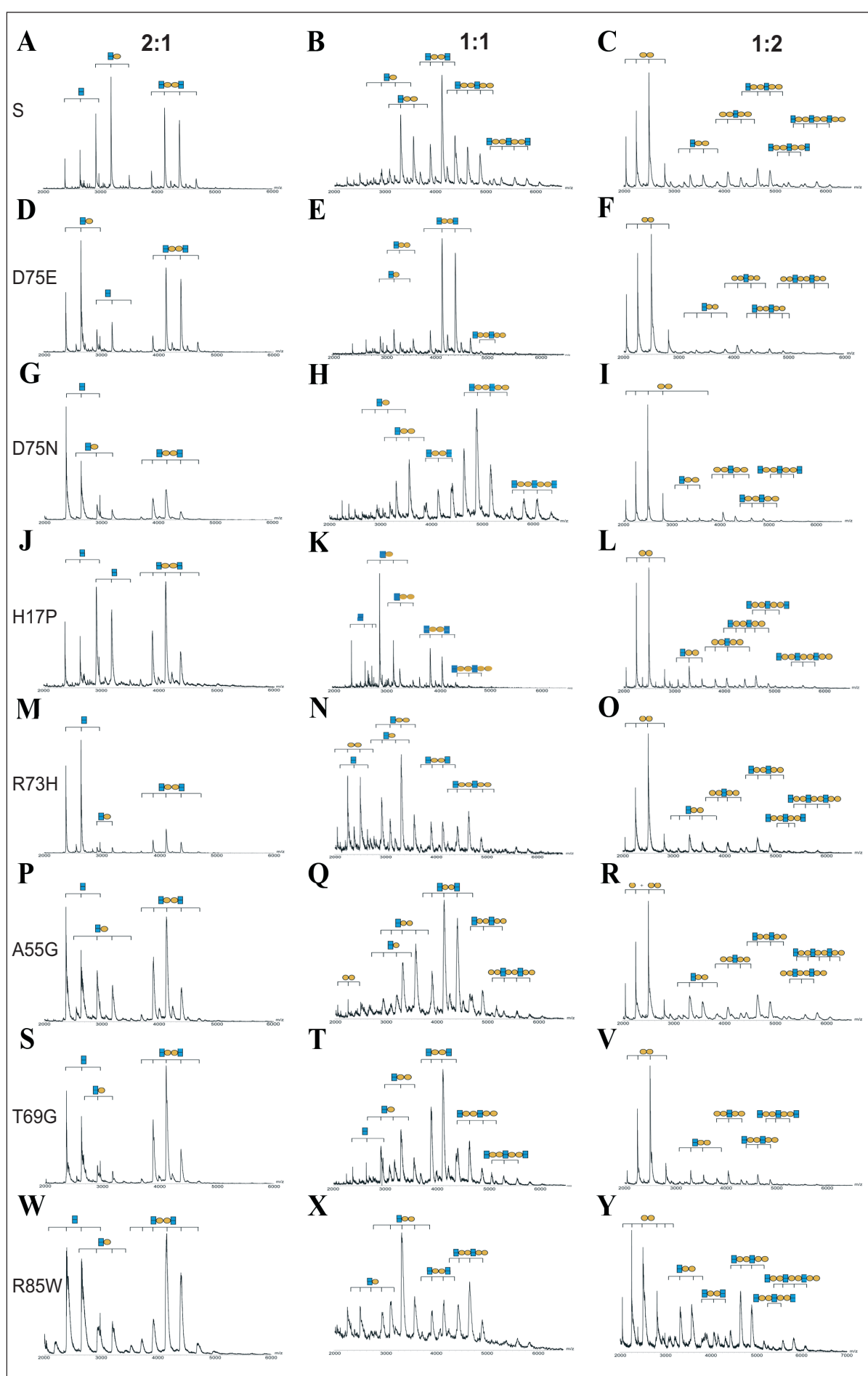
## Resultados

mutantes analizadas muestran un patrón de unión a Kis muy similar al obtenido para la proteína silvestre (**Figura 12 y tabla 6**).

Tabla 6.- Estequiometría de unión de los complejos Kis-Kid obtenidos para la proteína Kid silvestre. Las X representa la presencia de ese tipo de complejo en el espectro de EM obtenido.

Kid:Kis	2:1	1:1	1:2
Kid/Kid <sub>2</sub>	X	X	X (solo monómero)
Kis/Kis <sub>2</sub>		X	X
Kid <sub>2</sub> Kis <sub>2</sub>	X	X	
Kid <sub>2</sub> Kis <sub>2</sub>		X	X
Kid <sub>2</sub> Kis <sub>2</sub> Kid <sub>2</sub>	X	X	
Kis <sub>2</sub> Kid <sub>2</sub> Kis <sub>2</sub>			X
Kid <sub>2</sub> Kis <sub>2</sub> Kid <sub>2</sub> Kis <sub>2</sub>		X	X
Kis <sub>2</sub> Kid <sub>2</sub> Kis <sub>2</sub> Kid <sub>2</sub> Kis <sub>2</sub>			X

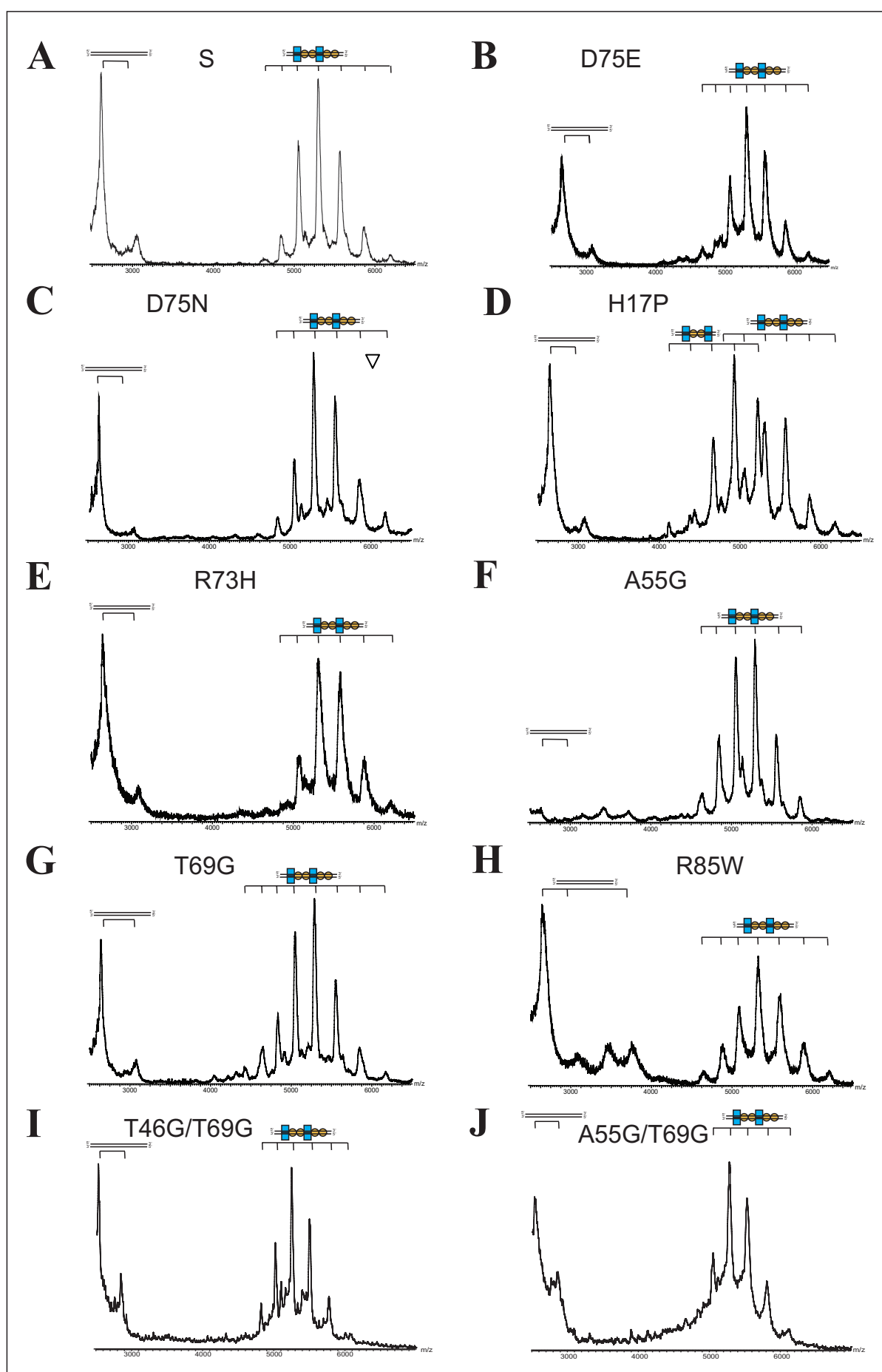
Figura 12.- Patrón de formación complejos Kis-Kid de las diferentes proteínas Kid silvestre y mutantes. Los complejos obtenidos a las diferentes relaciones Kid:Kis se analizaron mediante EM. Los espectros de la primera columna corresponden a una relación Kid:Kis de 2:1, siendo 1 en todos los casos 10  $\mu$ M; la segunda columna se corresponde con una relación 1:1 y la tercera con una relación 1:2 Kid:Kis. A, B y C se corresponden con la proteína silvestre; D, E y F con la proteína KidD75E; G, H, I con KidD75N; J, K y L con KidH17P; M, N y O con KidR73H; P, Q y R con KidA55G; S, T y V con KidT69G y por último W, X e Y con KidR85W.



#### 1.4 Los complejos formados por las proteínas Kid mutantes y Kis tienen capacidad de unión a ADN.

Los datos de EM (Kamphuis y col., 2007) indicaron que Kis y Kid en solución y en una relación 1:1, forman complejos con distinta estequiometría de unión, entre los que se encuentra la forma octamérica  $Kid_2-Kis_2-Kid_2-Kis_2$ . Esta especie molecular se convierte en la única especie molecular identificada sobre el ADN en presencia de cada una de las secuencias específicas de la región promotora-operadora (I y II). Estos resultados indican que, probablemente, el heterooctámero es el complejo regulador que reprime la transcripción del operón *kis-kid* (Monti y col., 2007). Para comprobar si las proteínas Kid mutantes mantenían la capacidad de formar este complejo octamérico, se utilizó un ADN de 30 pb que contenía la región I del operón *parD* (**Materiales y Métodos**). Este ADN mimetiza parte de la región promotora-operadora del sistema y permite ensayar la unión de las diferentes proteínas Kid mutantes, en complejo con Kis, a esta región del ADN. Se utilizó una relación Kis:Kid:ADN 5:5:1 en la que la concentración de proteínas fue de 15  $\mu$ M. En la **figura 13** se muestran los patrones de unión obtenidos para los diferentes mutantes ensayados. Se observa que ninguna de las mutaciones introducidas en Kid interfiere con su capacidad para formar el complejo octamérico en presencia de Kis, uniéndose al ADN que contiene la región promotora.

Figura 13.- Formación de los complejos Kis-Kid-*parD* por las proteínas Kid silvestre y mutantes. El análisis se realizó mediante EM. La relación Kis:Kid:ADN fue 5:5:1, donde la concentración de ADN fue 3  $\mu$ M. El monómero de Kid se muestra con un cuadrado azul y el de Kis con un círculo amarillo. El fragmento de ADN similar a *parD* se indica con una doble hebra. Los complejos se representan con una combinación apropiada de cuadrados, círculos y de doble hebra. Los complejos Kis-Kid-ADN mostrados corresponden a Kid silvestre (A), KidD75E (B), KidD75N (C), KidH17P (D), KidR73H (E), siendo estas mutaciones las que afectan a residuos del centro catalítico. KidA55G se muestra en (F), KidT69G en (G), KidR85W en (H), KidT46G/T69G en (I) y KidA55G/T69G en (J); todas estas mutaciones afectan a residuos posiblemente implicados en interacciones con el ARN sustrato.



Para determinar la capacidad de las proteínas Kid mutantes de unirse, en complejo con Kis, al ADN se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), similares a los descritos anteriormente (Monti y col., 2007). En este tipo de ensayo se utilizó un fragmento de ADN de 175 pb que contiene la región promotora *parD*.

Los ensayos muestran bandas de ADN de diferente movilidad electroforética (**Figura 14**). Se observa una banda de menor movilidad electroforética que correspondería al fragmento de ADN unido a la proteína Kis (c1), mientras que el resto de las bandas, con mayor retraso en su movilidad, se pueden asignar a la interacción con complejos Kis-Kid con diferente estequiometría (c2). La banda de mayor movilidad se corresponde con el ADN no unido a complejos Kis-Kid (ADNI). En este ensayo se incluye la proteína mutante KidE91K en la que, aún teniendo afectada su capacidad de regular la expresión del sistema (Lemonnier y col., 2004), no es posible apreciar, en las condiciones ensayadas, diferencias significativas en su unión al ADN. En resumen, todas las proteínas Kid silvestre y mutantes que han sido ensayadas forman complejos toxina-antitoxina que mantienen su capacidad para unirse al ADN.

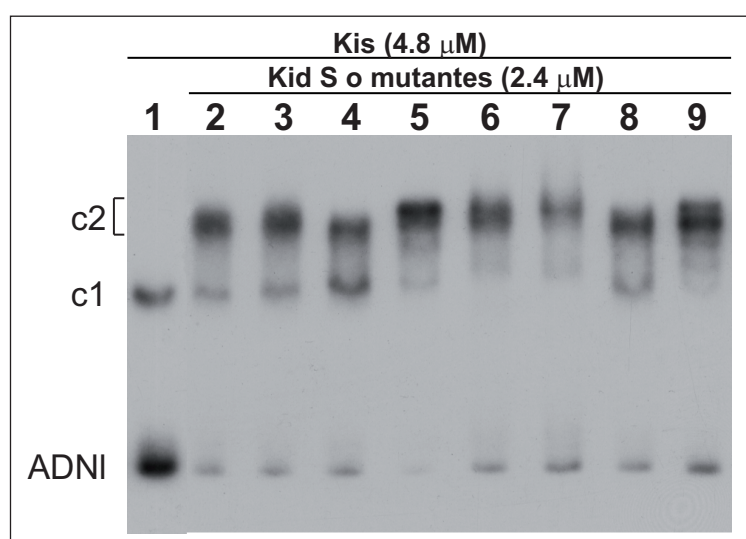


Figura 14.- Interacción de Kis y de las diferentes proteínas Kid, silvestre y mutantes, con la región promotora-operadora del sistema *parD*. Los ensayos de retardo en gel se llevaron a cabo con el fragmento *parD* (2 nM) y Kis (4,8  $\mu$ M) sola o en presencia de las distintas proteínas Kid ensayadas (2,4  $\mu$ M). La calle 1 muestra los complejos obtenidos por la unión de la proteína Kis al ADN. Las calles 2-9 corresponden a complejos proteína-ADN, obtenidos por la unión de Kis en presencia de las distintas proteínas Kid silvestre (2) o mutantes KidD75E (3), KidR73H (4), KidD75N (5), KidH17P (6), KidA55G (7), KidT69G (8) y KidE91K (9). El ADN libre se señala como ADNI, mientras que los diferentes complejos obtenidos como c1 y c2.



### 1.5 Las mutaciones en Kid no afectan a la capacidad de regulación del operón *parD*.

Se realizaron ensayos para correlacionar la capacidad de las distintas proteínas Kid mutantes de formar el complejo octamérico y de unirse a un fragmento que contenía la región operadora completa, con su capacidad para regular el operón *parD*. La actividad reguladora se determinó mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa, utilizando estirpes *lac*- portadoras del plásmido pMLM132 que contiene el gen *lacZ* fusionado transcripcionalmente al promotor del sistema *kis-kid*. Para proporcionar en *trans* las proteínas Kid y Kis, se usaron derivados del plásmido pAB24 que contenían el sistema *kis-kid* completo conteniendo en cada caso las distintas mutaciones en *kid*. La acción concertada de las diferentes proteínas Kid y Kis sería la encargada de regular los niveles de  $\beta$ -galactosidasa que determina la actividad del promotor *parD*, en el plásmido pMLM132. Los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa se cuantificaron en Unidades Miller. Los resultados obtenidos muestran que ninguna de las mutaciones introducidas en *kid* parece afectar a su capacidad co-reguladora *in vivo*, excepto el mutante KidE91K (Figura 15). Dicho mutante se utilizó como control positivo de desregulación del sistema *parD* (Lemonnier y col., 2004).

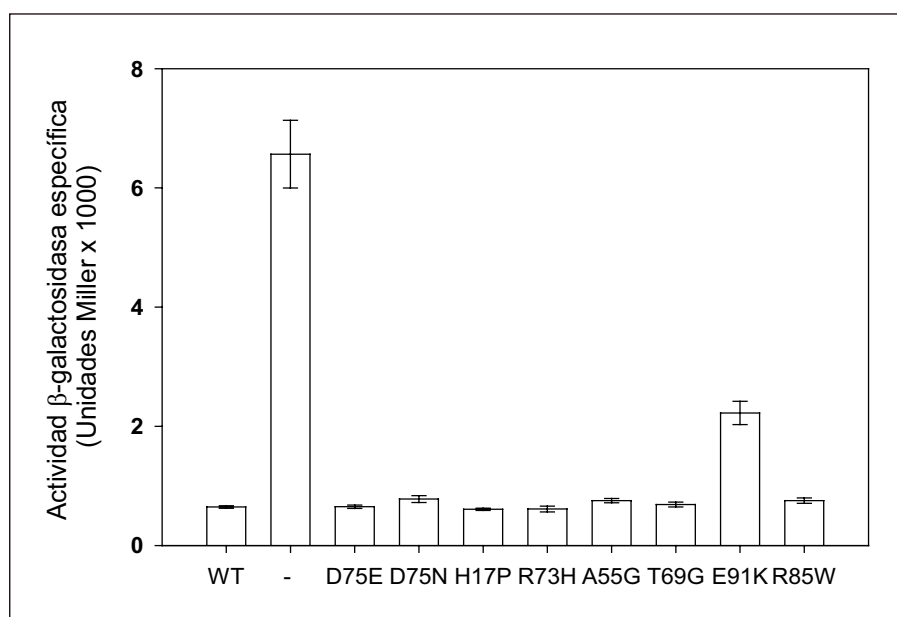


Figura 15.- Niveles de regulación del promotor *parD* detectadas por la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Se detectó la actividad  $\beta$ -galactosidasa correspondiente a la actividad del promotor *parD* del plásmido pMLM132, las distintas proteínas Kid y Kis se codificaban en plásmidos derivados de pAB24. El gráfico muestra los valores medios de actividad  $\beta$ -galactosidasa, en unidades Miller, de tres experimentos independientes. Las barras de error indican sus desviaciones estándar. El control sin el sistema *parD* se realizó con el plásmido pBR322.

La capacidad para formar complejos con la antitoxina Kis de los distintos mutantes Kid, su capacidad para actuar como co-reguladores del sistema *parD* y los datos espectroscópicos (Resultados 1.2), indican que los mutantes conservan la estructura de la toxina y su capacidad de interaccionar funcionalmente con la antitoxina y que en consecuencia pueden utilizarse para analizar con especificidad sus posibles efectos en la unión y rotura del ARN sustrato.



### 1.6 Identificación de residuos implicados en la unión de Kid al sustrato de ARN.

Se evaluó la capacidad de las proteínas mutantes KidT46G, KidA55G, KidT69G, KidR85W y de los dobles mutantes KidT46G/T69G y KidA55G/T69G para unirse al ARN. Estas mutaciones, según el modelo propuesto por Kamphuis y colaboradores (Kamphuis y col., 2006), afectan a residuos que interaccionan con el ARN.

Para el análisis, se utilizó como sustrato un ARN con secuencia 5'-AdUACA-3' (ARN-dU, ARNI), que carece del 2'-OH necesario para el ataque nucleofílico que inicia la reacción de corte y que en consecuencia no es procesable por la toxina. Dicho sustrato fue previamente utilizado para modelar la unión de Kid al ARN (Kamphuis y col., 2006), y contiene en el centro de su secuencia las bases consenso en las que diversos autores han encontrado corte por PemK/Kid (Zhang y col., 2004, Munoz-Gomez y col., 2005, Pimentel y col., 2005).

Las muestras que contenían cantidades equimoleculares de las proteínas Kid (silvestre o mutantes) y del ARN (15  $\mu$ M) se analizaron mediante EM. El espectro de masas obtenido para la proteína Kid silvestre se muestra en la **figura 16**, donde se indican los picos obtenidos para la proteína libre y unida. Este tipo de espectro es similar al obtenido para el resto de las proteínas Kid mutantes analizadas. En todos los casos se detectaron 5 picos que correspondían con las diferentes formas de ionización de la proteína libre (**Figura 16, a-e**) y además, picos correspondientes a las formas de ionización del dímero de proteína Kid unido a una molécula de ARN (**Figura 16, f-h**).

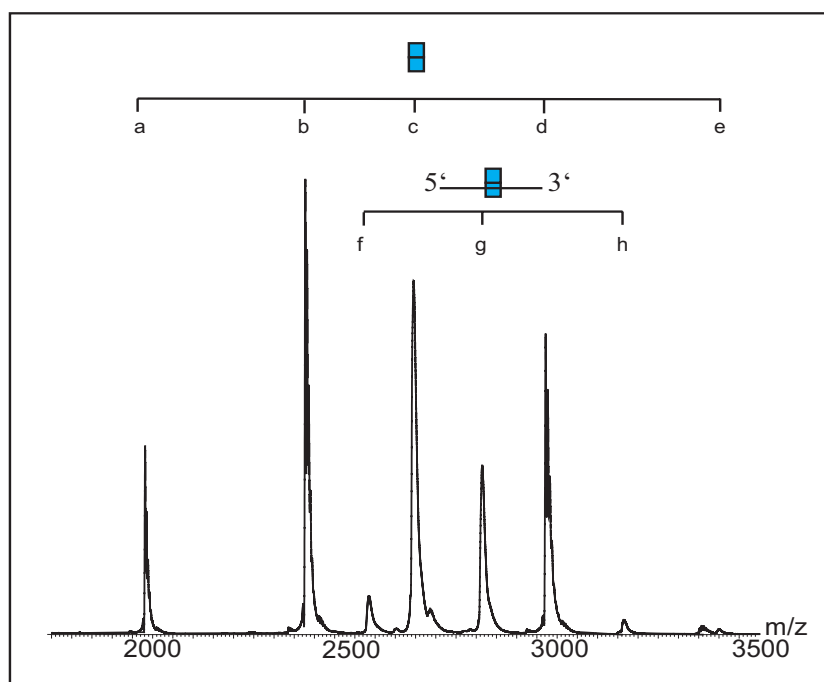


Figura 16.- Espectro de masas obtenido para la unión de la proteína Kid silvestre con el ARN 5'-AdUACA-3'. En este tipo de ensayo se utilizó el sustrato análogo a ARN, 5'-AdUACA-3' que no es escindible por Kid. La concentración de sustrato y proteína en el ensayo, fue 15  $\mu$ M en ambos casos. El monómero de la proteína Kid se muestra como un cuadrado azul y el sustrato de ARN como una línea. Los picos a-e muestran las formas de ionización del dímero de Kid libre, mientras que los picos f-h, indican las especies de ionización correspondientes al dímero de Kid unido a una molécula de ARN.

Tras la cuantificación de los espectros de EM obtenidos para cada una de las proteínas analizadas, los resultados mostraron que, en comparación con el porcentaje de unión de la proteína Kid silvestre ( $18,4 \pm 0,8$  %), existe una disminución en el porcentaje de proteína unida al sustrato de ARN, que es estadísticamente significativa para las proteínas KidA55G ( $11,9 \pm 1,5$  %), KidT69G ( $12,3 \pm 0,8$  %) y KidT46G ( $13,4 \pm 1,2$  %) (**Figura 17**). Estos resultados indican que los residuos T46, A55 y T69 contribuyen significativamente a la unión, con la particularidad de que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de unión encontrados en las diferentes mutaciones en estos residuos. Este no es el caso de la proteína KidR85W, donde el porcentaje de proteína unida a ARN, respecto al de proteína libre, se vio drásticamente reducido ( $6,8 \pm 1,9$  %) en comparación con el de la proteína silvestre ( $18,4 \pm 0,8$  %), indicando que la mutación KidR85W impide de forma eficiente la unión de la toxina al ARN (**ver Discusión**).

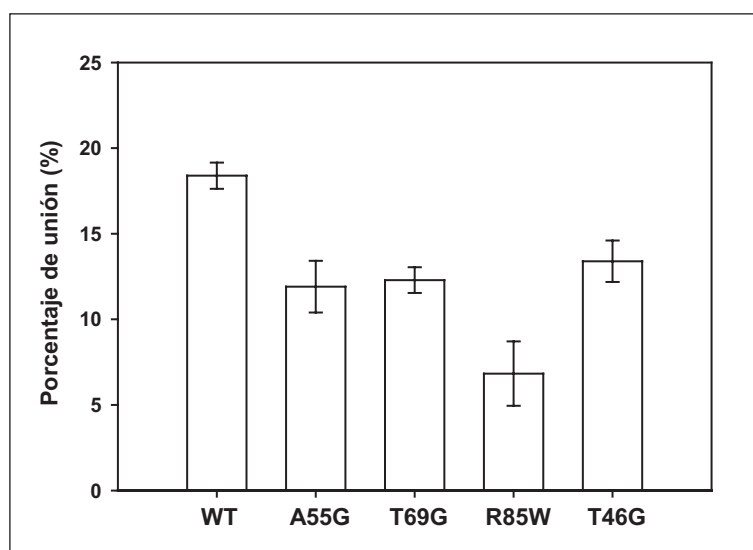


Figura 17.- Efecto de las mutaciones en *kid* sobre la capacidad de las proteínas de unirse al ARN, medidas por espectrometría de masas nativa. Los ensayos fueron llevados a cabo usando las proteínas Kid silvestre y mutantes y un sustrato mimético del ARN no procesable (5'-AdUACA-3'). Las proteínas y el ARN se añadieron a 15  $\mu$ M. Se muestra el porcentaje de proteína unida respecto a la proteína total de las proteínas Kid silvestre, KidT46G, KidA55G, KidT69G y KidR85W. La desviación estándar encontrada para tres experimentos independientes se muestra como barras de error.

Se evaluó mediante espectrometría de masas la actividad catalítica de las proteínas Kid, anteriormente mencionadas, sobre un sustrato de ARN procesable, ARNII 5'-AUACA-3', previamente utilizado para establecer el modelo de corte y unión de la toxina (Kamphuis y col., 2006). Este sustrato contiene la secuencia central consenso de corte 5'-UAC-3'. Se determinó el progreso de la reacción de corte en el tiempo, midiendo la cantidad de ARN no procesado frente a la formación concomitante de los fragmentos originados en la reacción de corte (**Figura 18A**). En todos los casos, los productos que se observaron correspondieron a las especies esperadas para un corte específico que se produce en 5' de la A (AU, 636,1 Da y ACA, 902,2 Da, datos no mostrados); esto indica que las muestras no contenían contaminación con

## Resultados

ARNasas inespecíficas. Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó el sustrato ARNIII, 5'-UUACU-3', aunque, coincidiendo con los datos anteriormente descritos (Kamphuis y col., 2006), se tuvo que utilizar una concentración de proteínas 100 veces menor (**Figura 18B**). En este caso, y también en todas las reacciones, se observaron los productos esperados para un corte específico en 5' de la segunda U (UU, 614 Da y ACU, 880 Da); ello indica que el corte es específico y confirma asimismo la ausencia de contaminación con ARNasas inespecíficas. En la **figura 19** se muestran los espectros de masas típicos observados en tres tiempos de la reacción de corte para algunas de las proteínas ensayadas.

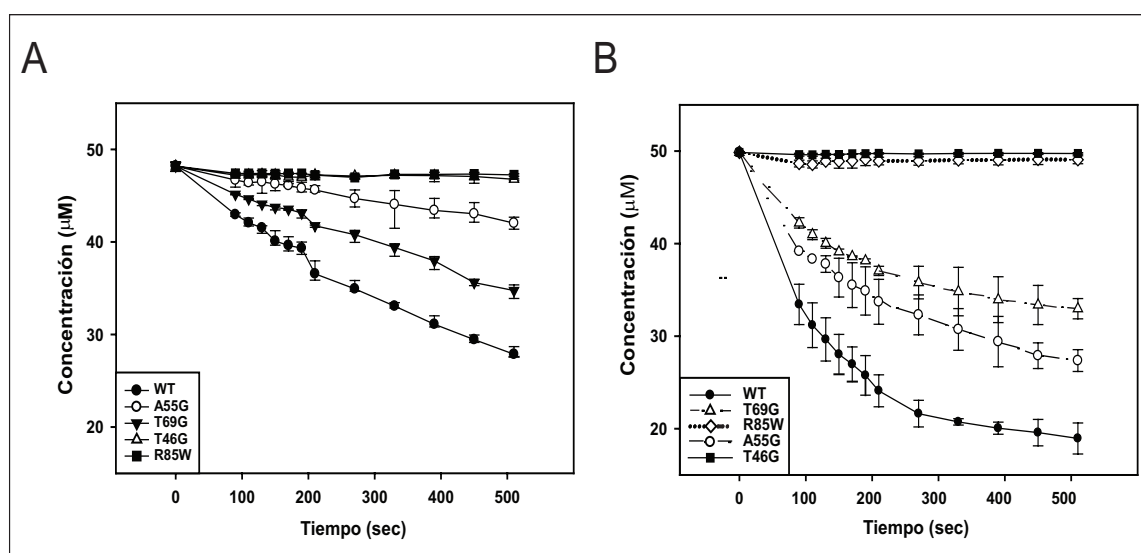


Figura 18.- Efecto de las mutaciones en Kid sobre la capacidad de corte de ARN medido por espectrometría de masas. Los ensayos se llevaron a cabo usando los ARNs a 50 μM y las proteínas a 20 μM, en el caso del sustrato de ARN 5'-AUACA-3' (A) o 0,2 μM en el caso del sustrato de ARN 5'-UUACU-3' (B). Se indica la cantidad de ARN no procesado durante los diferentes tiempos de la reacción, en presencia de las proteínas Kid silvestre, KidT46G, KidA55G, KidT69G y KidR85W. Las barras de error muestran la desviación estándar encontrada para tres experimentos independientes.

La cantidad de ARN no procesado que se obtuvo con KidA55G y con KidT69G disminuyó gradualmente con el tiempo, a la vez que aumentaron, a la misma velocidad, los productos procedentes del corte. Los patrones de corte obtenidos cuando se usó el sustrato ARNIII 5'-UUACU-3', fueron bastante similares a los obtenidos con el sustrato ARNII 5'-AUACA-3' (**Figuras 18A y 18B**). Esto indica que los mutantes retienen una actividad ARNasa básica sobre estos sustratos. Sin embargo, el nivel de corte obtenido con ambos mutantes fue menor que el obtenido con la proteína silvestre, utilizándose uno u otro sustrato. Probablemente, esta disminución sea debida a los efectos adversos que las mutaciones A55G y T69G producen sobre la unión al ARN (**Figura 17**). Al ensayar el corte sobre ARNs sustratos más largos (CopA, CopT y TAR), se observó que las proteínas mutantes retienen la actividad ARNasa, aunque la proteína KidA55G parece tener disminuida su capacidad de corte sobre estos sustratos (**Figura 20**). Ensayos realizados en extractos de *E. coli* en los que se analizó el corte de CopT por

estos mutantes, indicaron que ambas proteínas se comportan de forma similar a la proteína silvestre con un patrón de corte que indica que la mutación no altera la especificidad de corte. (Figura 21).

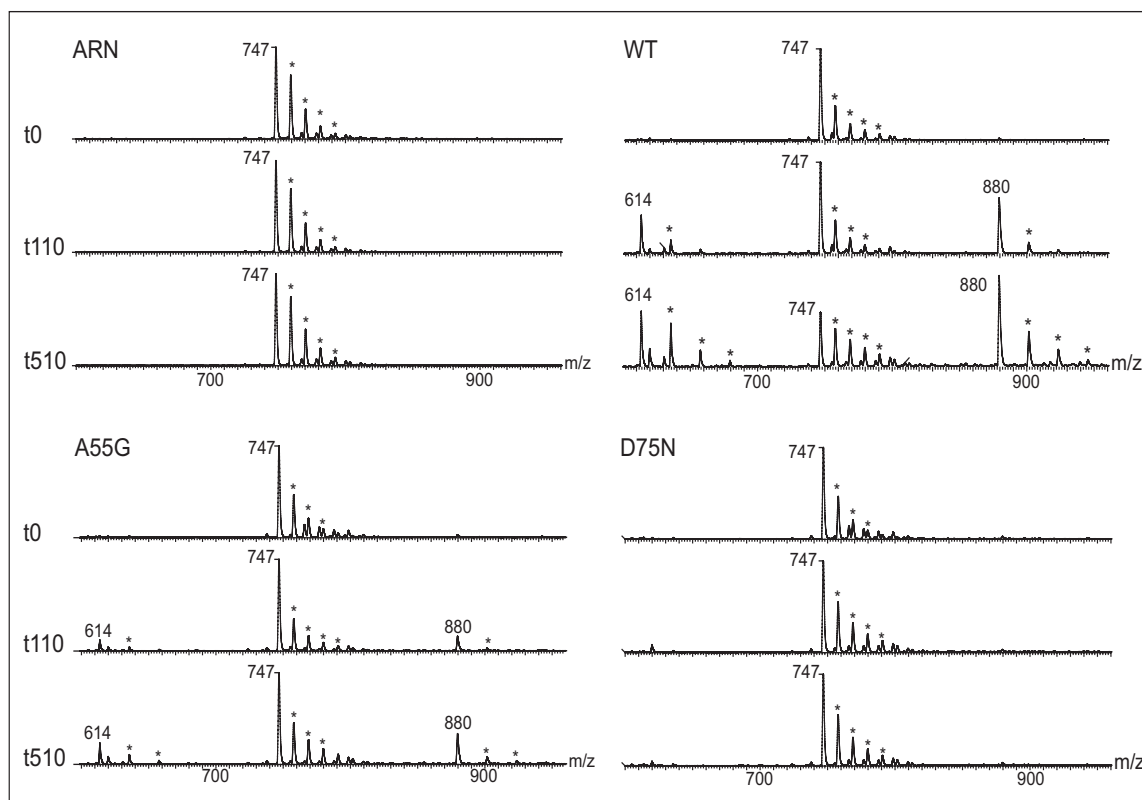


Figura 19.- Progresión de las reacciones de corte del ARN 5'-UUACU-3' por las proteínas Kid silvestre y mutantes, analizada mediante espectrometría de masas, donde se detectan el ARN no catalizado y los productos de corte derivados de la reacción. Las reacciones se monitorizaron durante 510 segundos. Se muestran los espectros obtenidos a distintos tiempos de la reacción (0, 110 y 510 segundos). ARN: la muestra de ARN a la que no se le añade proteína; S: ensayo de corte del ARN con la proteína silvestre; D75N: ensayo de corte del ARN con la proteína KidD75N; A55G: ensayo de corte del ARN con la proteína KidA55G. 747 m/z corresponde a la molécula de ARN doblemente cargada, 614 m/z corresponde al producto de la reacción de corte UU y 880 m/z corresponde al producto ACU. Los aductos sódicos y potásicos se indican con \*.

La propuesta de que el menor corte de los sustratos pequeños en estos dos mutantes es debido a una unión menos eficiente con el ARN (Figura 17), es consistente con los resultados obtenidos con la proteína KidR85W. En este caso, la interacción de KidR85W y el ARN se vio drásticamente reducida, lo que se correlaciona con una gran disminución de su actividad ARNasa (Figuras 17 y 18). Cuando se ensayó la actividad de corte de este mutante *in vitro* sobre sustratos más largos (CopT, CopA y TAR), se pudo detectar una actividad ARNasa residual que indica que no existen cambios de especificidad en el corte (Munoz-Gomez y col., 2005). La mutación T46G también produjo una reducción drástica en la actividad de corte del ARN tanto en sustratos largos como cortos (Figuras 18 y 20), aunque, en este caso, se podía medir la capacidad de unión de la proteína, siendo ésta similar a la obtenida para los

## Resultados

mutantes KidA55G y KidT69G. Posiblemente, los datos obtenidos indican un efecto adicional de la mutación T46G sobre el centro activo de la proteína (**ver discusión**).

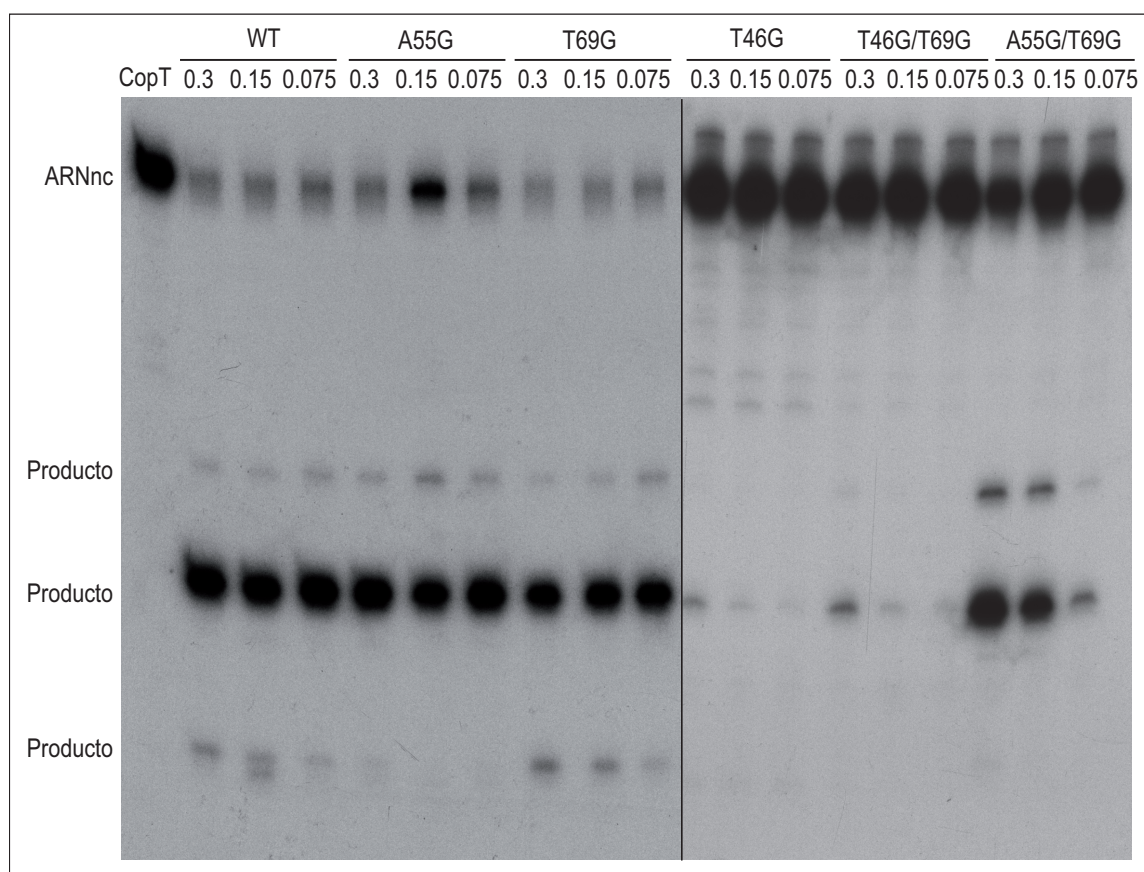


Figura 20.- Ensayo *in vitro* del corte del ARN CopT por las diferentes toxinas Kid. Se analizó el corte de CopT, marcado radiactivamente en su extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ - $\gamma\text{ATP}$ , por las toxinas Kid silvestre y mutantes. Las concentraciones utilizadas fueron las indicadas (0,3, 0,15 y 0,075  $\mu\text{M}$ ). Se indican los productos de corte generados al añadir las proteínas Kid silvestre, KidA55G, KidT69G KidT46G, KidT46G/T69G y KidA55G/T69G.



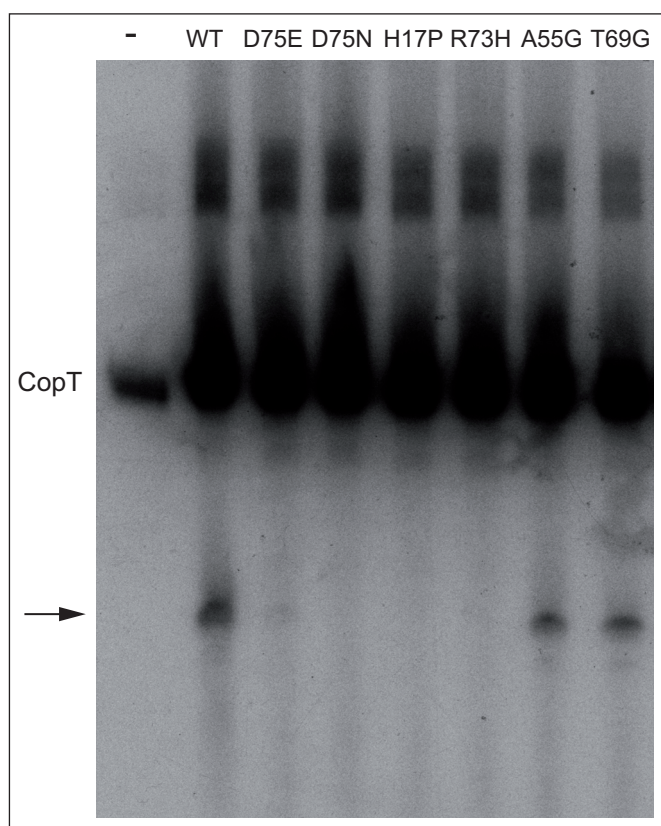


Figura 21.- Ensayo *in vitro* del corte del ARN CopT por las diferentes toxinas Kid en extractos de *E. coli*. Se analizó el corte de CopT marcado en su extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ ATP. Las proteínas (Kid silvestre, KidD75E, KidD75N, KidH17P, KidR73H, KidA55G y KidT69G) a una concentración final de 0,3  $\mu\text{M}$  se añadieron a la mezcla del extracto S30 de *E. coli* conteniendo el ARN CopT. Las reacciones de corte se llevaron a cabo durante 75 segundos y los productos del corte se analizaron en geles desnaturalizantes al 4 % de poliacrilamida. El producto de la reacción de corte se indica con una flecha y el ARN CopT sin procesar como CopT.

Las proteínas KidT46G, KidA55G, KidT69G y KidR85W tienen afectada su capacidad de unirse al ARN. Las proteínas KidA55G y KidT69G mantienen la actividad ARNasa de la proteína. La proteína KidR85W tiene una actividad ARNasa mucho menor, mientras que la proteína KidT46G tiene afectada su actividad ARNasa pudiendo estar contribuyendo al centro activo. Los resultados apoyan las predicciones del modelo al mismo tiempo que indican complejidades adicionales relacionadas con la función del residuo T46.

Los ensayos de unión y corte del ARN también se llevaron a cabo con los dobles mutantes KidA55G/T69G y KidT46G/T69G. Estas mutaciones afectan a residuos que posiblemente están implicados en interacciones con el ARN. Se analizó su capacidad para unirse a un sustrato mimético al ARN, el ARNI 5'-AdUACA-3'. Tras analizar las muestras por EM y semicuantificar los datos, se obtuvieron porcentajes relativos de unión de  $13,1 \pm 0,8$  % para KidT46G/T69G y de  $13,9 \pm 0,8$  % para KidA55G/T69G, que son similares a los obtenidos para las proteínas con mutaciones sencillas ( $11,9 \pm 1,5$  % para KidA55G,  $12,3 \pm 0,8$  % para KidT69G y  $13,4 \pm 1,2$  % para KidT46G) (**Figura 22A**). Los valores de unión obtenidos para los mutantes fueron estadísticamente diferentes al obtenido para la proteína silvestre. El análisis de los datos procedentes de los ensayos de corte del ARN, indicó que en este caso existían mayores diferencias entre los mutantes analizados (**Figuras 22B y 2C**). La proteína Kid que contenía la doble mutación A55G/T69G mostró una menor eficiencia de corte en comparación

## Resultados

con las proteínas que contenían las mutaciones sencillas. Se observó que la menor eficiencia de corte era más pronunciada cuando se utilizó el sustrato 5'-AUACA-3', aunque su actividad ARNasa fue claramente observada con el uso del sustrato 5'-UUACU-3' (**Figura 22C**). El doble mutante KidT46G/T69G, al igual que el mutante sencillo KidT46G, carecía de actividad ARNasa sobre ambos sustratos cortos. Ambas proteínas con las dobles mutaciones, fueron capaces de formar los complejos con la antitoxina (datos no mostrados) y de formar el complejo octamérico con la región promotora-operadora *parD* (**Figura 13**). Estos datos indican que los resultados de los distintos mutantes en los ensayos de unión y corte del ARN no son debidas a efectos inespecíficos asociados con las mutaciones analizadas.

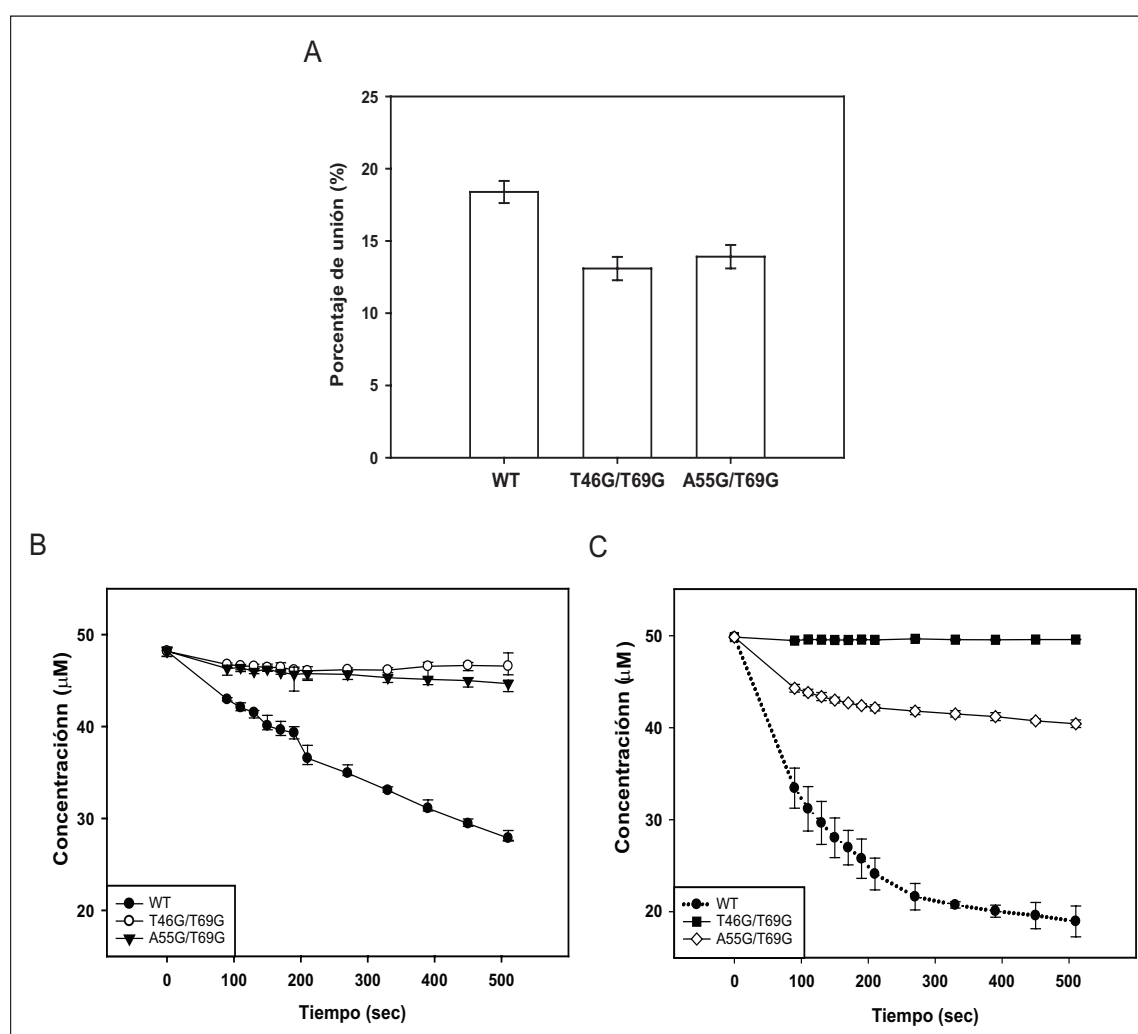


Figura 22.- Unión y corte del ARN por las proteínas Kid silvestre, KidT46G/T69G, KidA55G/T69G. A) Ensayo de unión proteína-ARN al sustrato no procesable 5'-AdUACA-3', medido por espectrometría de masas nativa. La concentración usada de ARN y de las proteínas fue de 15 μM. Se muestra el porcentaje de proteína unida respecto a la proteína total, las barras de error indican la desviación estándar encontrada para tres experimentos independientes. B) Ensayo de corte del ARN 5'-AUACA-3' (50 μM) por las proteínas Kid silvestre, KidT46G/T69G y KidA55G/T69G (20 μM). C) Ensayo de corte del ARN 5'-UUACU-3' (50 μM) por las proteínas Kid silvestre, KidT46G/T69G y KidA55G/T69G (0,2 μM). En ambos casos se indica la cantidad de ARN no procesado en los diferentes tiempos del ensayo de corte. Las barras de error muestran la desviación estándar obtenida de tres experimentos independientes.

### 1.7 Las mutaciones que afectan a residuos del centro activo impiden la rotura del ARN pero no la unión de la toxina al mismo.

Los mutantes KidR73H, KidD75E, KidD75N y KidH17P contienen sustituciones en residuos que el modelo propone estar directamente implicados en el corte del ARN sustrato (Kamphuis y col., 2006). Se analizaron los efectos de las mutaciones sobre la capacidad de la toxina para unir y cortar ARN.

La capacidad para unirse al ARN de la proteína silvestre y de las proteínas mutantes, se evaluó mediante espectrometría de masas nativa, tal y como ha sido descrito en el apartado anterior. En todos los casos los porcentajes relativos de unión que se encontraron para las proteínas mutantes KidD75E, KidD75N, KidH17P y KidR73H ( $16,6 \pm 1,1$  %,  $18,6 \pm 1,1$  %,  $18,6 \pm 1,0$  % y  $17,5 \pm 0,7$  %) fueron similares a los de la proteína silvestre ( $18,4 \pm 0,8$  %), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las mismas (**Figura 23A**). Estos datos indican que las mutaciones en los residuos catalíticos no afectan esencialmente a la capacidad de la toxina para unirse al ARN.

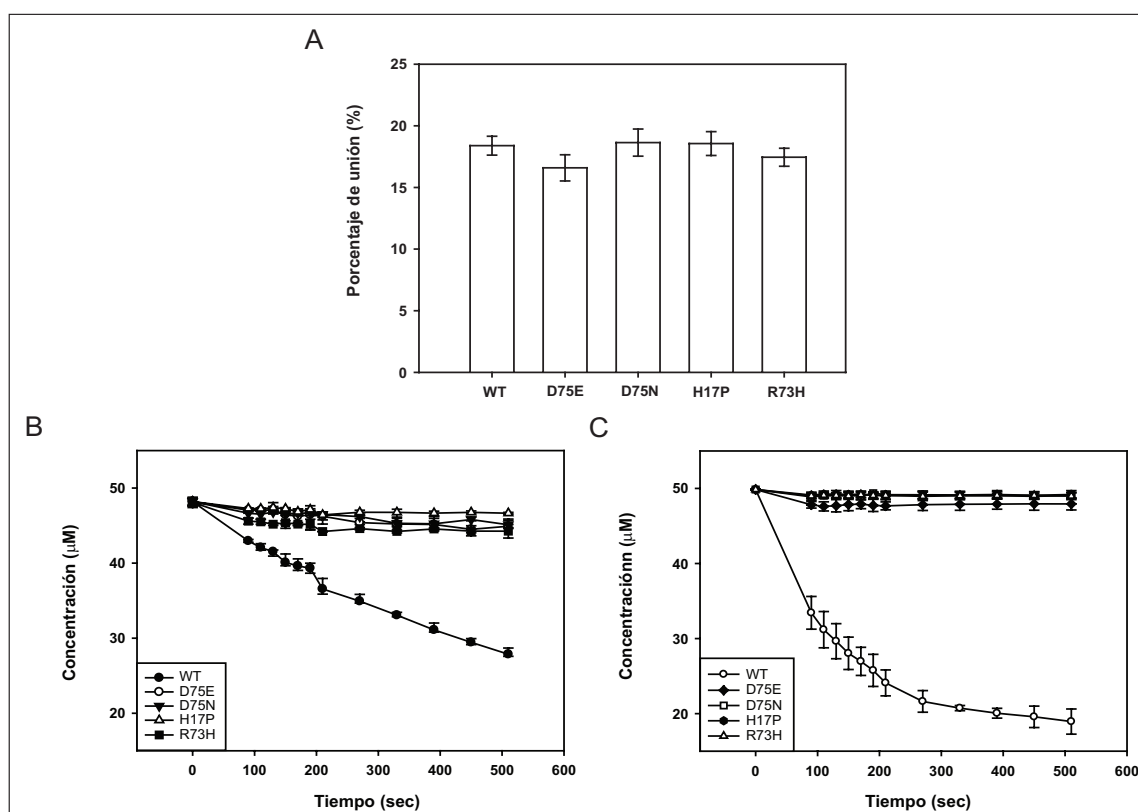


Figura 23.- Unión y corte del ARN por las proteínas Kid silvestre, KidD75E, KidD75N, KidH17P y KidR73H. A) Ensayo de unión al ARN no procesable 5'-AdUACA-3'. Tanto el ARN como las proteínas se utilizaron a una concentración de 15 μM. Se muestra el porcentaje de proteína unida respecto a la proteína total. Las barras de error indican la desviación estándar encontrada para tres experimentos independientes. B) Ensayo del corte del ARN 5'-AUACA-3' (50 μM) por las proteínas Kid silvestre, KidD75E, KidD75N, KidH17P y KidR73H (20 μM). C) Ensayo del corte del ARN 5'-UUACU-3' (50 μM) por las proteínas Kid silvestre, KidD75E, KidD75N, KidH17P y KidR73H (0,2 μM). En ambos casos (B y C) se indica la cantidad de ARN no procesado en los diferentes tiempos de la reacción de corte. Las barras de error muestran la desviación estándar encontrada para tres experimentos independientes.



Se monitorizó, mediante espectrometría de masas, el progreso del corte de los sustratos de ARN por las proteínas durante el tiempo de reacción (510 segundos). Se detectó la cantidad de los sustratos, 5'-AUACA-3' y 5'-UUACU-3', que permanecían intactos durante la reacción de corte, además de la cantidad de los productos derivados del corte. Las **figuras 23B y 23C** muestran que ninguna de las proteínas mutantes fue capaz de producir una disminución de la cantidad de sustrato no procesado. Este efecto fue similar al usarse cualquiera de los dos ARN sustratos y una cantidad apropiada de las proteínas para cada uno de ellos (0,2  $\mu$ M para el ARNIII, 5'-UUACU-3', ó 20  $\mu$ M para el ARNII, 5'-AUACA-3'). Estos datos indican que las mutaciones inactivan drásticamente la actividad ARNasa de la proteína. En los ensayos sobre los sustratos más largos (CopA, CopT y TAR) se vio que la proteína KidD75E retiene una actividad ARNasa medible pero muy disminuida en comparación con la proteína silvestre (**Figura 24**) (**ver Discusión**). Cuando se ensayó el corte de CopT, en extractos de *E. coli*, se vio que la capacidad del mutante para cortar este sustrato estaba inhibida (**Figura 21**), poniendo de manifiesto que *in vivo* pueden existir factores celulares adicionales que modulen la actividad de esta toxina, igual a lo que se encontró para la proteína mutante KidR85W.

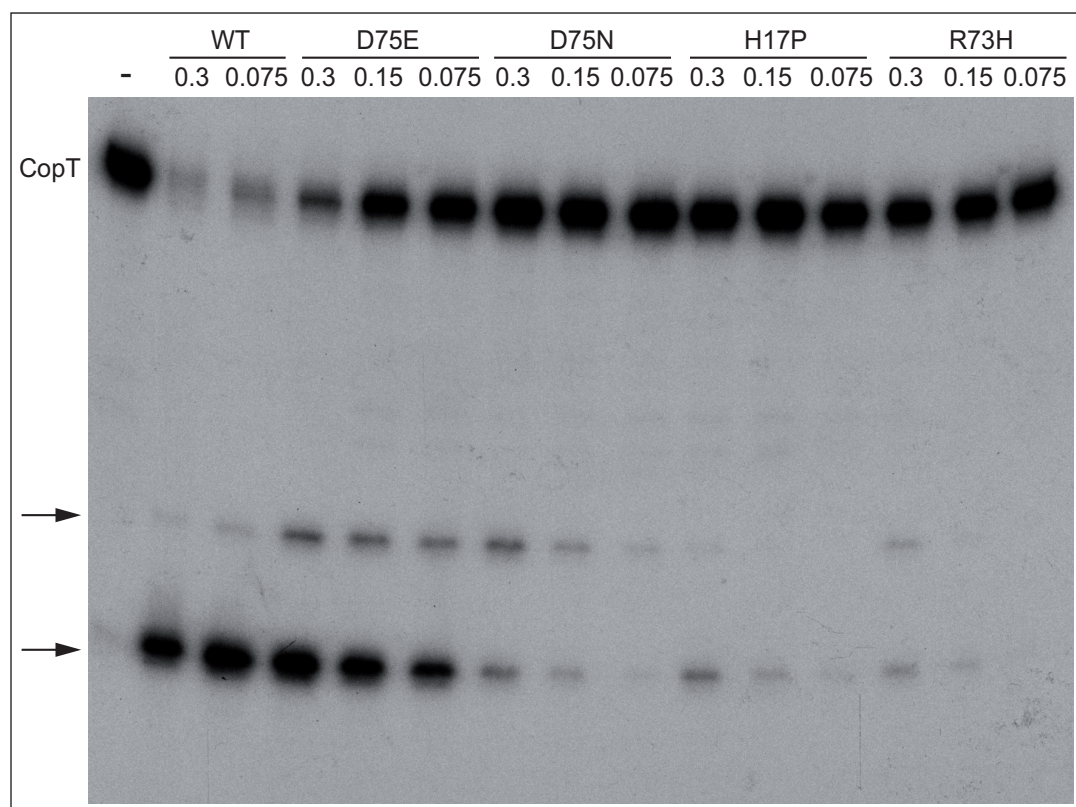


Figura 24.- Ensayo *in vitro* del corte del ARN CopT por las diferentes toxinas Kid. Se ensayó el corte del ARN CopT, marcado radiativamente en su extremo 5' con  $^{32}$ P- $\gamma$ ATP, por las toxinas a diferentes concentraciones tal y como se indica (0,075, 0,15 y 0,3  $\mu$ M). Se observan los productos de corte obtenidos al añadir las proteínas Kid silvestre, KidD75E, KidD75N, KidH17P y KidR73H. Los productos de la reacción de corte se indican con una flecha.

*Estos resultados son consistentes con el modelo que postula que los residuos D75, H17 y R73 tienen una participación específica en el mecanismo de corte de la toxina. Además, sugieren que la participación de estos residuos en la unión al ARN no es significativa, por lo que el residuo R73, a diferencia de lo propuesto por el modelo, no parece contribuir significativamente a dicha unión.*

### **1.8 Los efectos de las mutaciones sobre la actividad ARNasa se reflejan en la inhibición de la síntesis de proteínas.**

Se analizaron los efectos de las diferentes proteínas Kid mutantes sobre la síntesis de proteínas. Para ello, se utilizaron extractos celulares de *E. coli* en los que se monitorizó la síntesis de la proteína Luciferasa, proteína indicadora utilizada en este ensayo *in vitro* (**ver Métodos 2.6.2**). En estos ensayos el control positivo consistió en la adición del tampón de dilución de proteínas. Como control negativo, es decir, inhibición de síntesis de proteínas, se añadió cloranfenicol, antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas por bloqueo de la actividad peptidil-transferasa. El análisis mostró que las proteínas Kid silvestre, KidA55G y KidT69G claramente inhiben la síntesis de la Luciferasa, aunque la proteína KidA55G lo hace en menor medida que las proteínas Kid silvestre y KidT69G. El doble mutante KidA55G/T69G también inhibe la síntesis de proteínas pero en menor medida a como lo hacen los mutantes sencillos (incluso cuando se usó la concentración más alta de proteína: 0,6  $\mu$ M) (**Figura 25**). Este hecho es consistente con los datos anteriores, ya que estos mutantes, aunque tenían parcialmente afectada su capacidad de unión al ARN, no tenían inhibida su actividad ARNasa (**Figuras 17, 18 y 22**).

Se obtuvo un resultado completamente diferente cuando se ensayaron los mutantes KidD75E, KidD75N, KidH17P y KidR73H, afectados todos ellos en los residuos del centro activo de la proteína propuesto en el modelo. En estos casos, todas las mutaciones abolieron el potencial para inhibir la síntesis de proteínas de la toxina silvestre, incluso a la máxima concentración de proteína ensayada. El mismo resultado se obtuvo para la proteína KidR85W (**Figura 25**), siendo dicho resultado consistente con la drástica reducción de su capacidad de unión y corte del ARN (**Figuras 17 y 18**) y con la inhibición de su actividad ARNasa residual en extractos celulares. La proteína KidT46G no produjo inhibición de la síntesis de proteínas, lo que concuerda con su dificultad para cortar ARN. De igual forma, el doble mutante KidT46G/KidT69G no fue capaz de inhibir la síntesis de la Luciferasa (**Figura 25**).

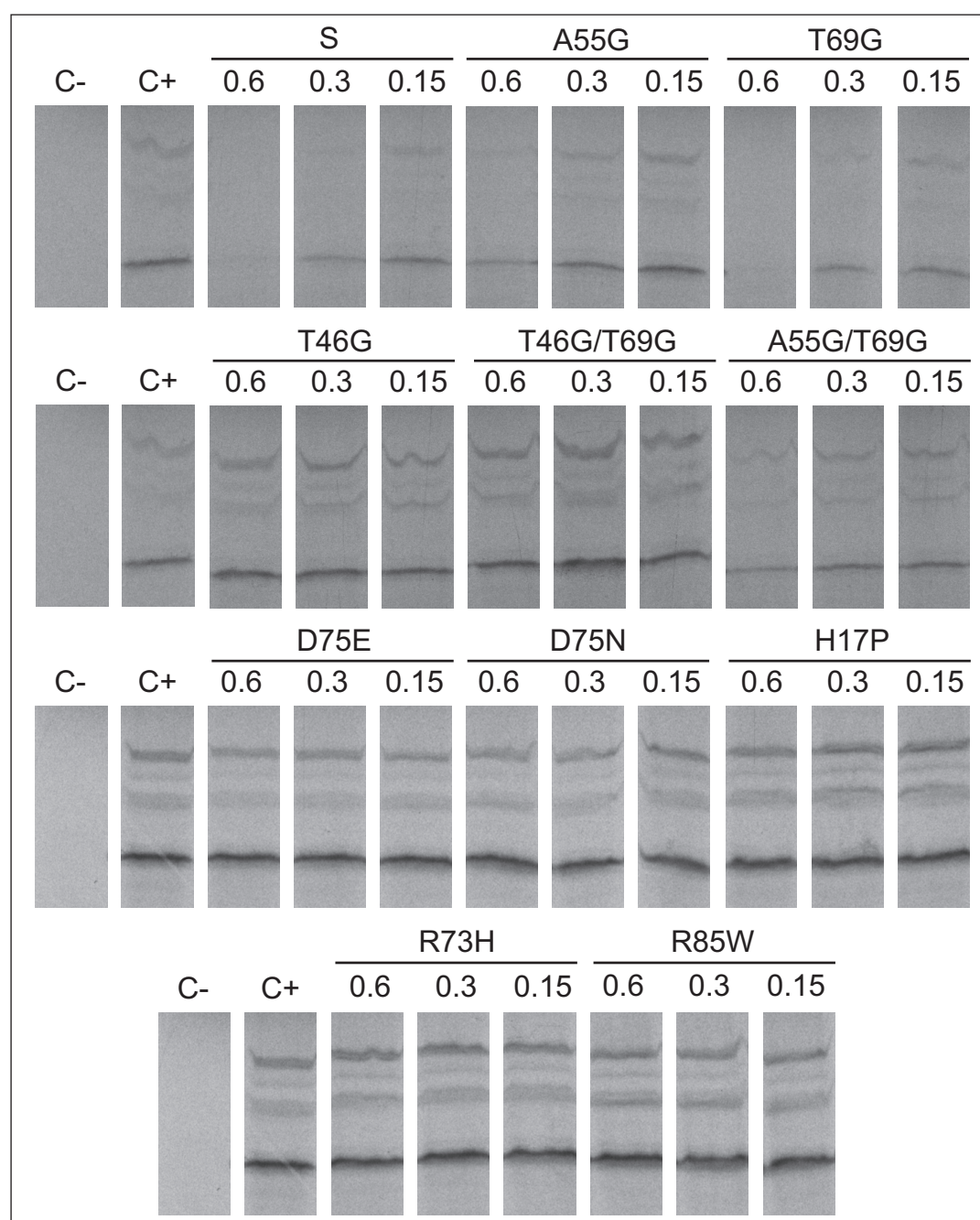


Figura 25.- Ensayos de inhibición de síntesis de proteínas con los diferentes mutantes. Se analiza el efecto de las diferentes proteínas Kid silvestre y mutantes en un ensayo de síntesis de Luciferasa marcada con  $^{35}\text{S}$ -metionina. Se utilizaron diferentes concentraciones de las proteínas, 0,15, 0,3 y 0,6  $\mu\text{M}$  en cada caso. C-, control negativo, incluye cloranfenicol, un inhibidor de traducción, a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , C+, control positivo, se obtuvo al añadir el tampón de dilución de las proteínas. El resto de las calles muestran los ensayos en presencia de las proteínas Kid silvestre (S), KidA55G, KidT69G, KidT46G, KidT46G/T69G, KidD75E, KidD75N, KidR73H, KidH17P y KidR85W. Las bandas inferiores observadas corresponden a productos de iniciación de la traducción internos de la Luciferasa.

*Por lo tanto, los resultados de inhibición de traducción se correlacionan con los niveles de actividad ARNasa observados en las proteínas.*

### 1.9 La toxicidad de las proteínas Kid silvestre y mutantes se correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas y con su actividad ARNasa.

Seguidamente, se analizaron los efectos de las proteínas silvestre y mutantes sobre el crecimiento y capacidad de formar colonias de las células en las que se expresan. Para esta evaluación, las diferentes mutaciones fueron introducidas, por mutagénesis dirigida, en los vectores recombinantes multicopia pBR1120 o pAB1120 que contienen el sistema *kid-kis* (**ver Materiales y Métodos**). Estos recombinantes llevan, además, un codón de terminación de la traducción prematuro (ámbar), en el gen de la antitoxina (*kis74*). En la cepa OV2 (*supFts*) la mutación ámbar de *kis* está suprimida a 30 °C pero no a 42 °C. La toxicidad de los distintos mutantes Kid puede, en consecuencia, monitorizarse a 42 °C en dicha cepa conteniendo el recombinante apropiado (**ver Métodos 2.15**).

El análisis mostró que a 30 °C los cultivos que expresaban las diferentes mutantes Kid crecieron con una eficiencia y viabilidad similar. A 42 °C se pusieron de manifiesto las diferencias existentes entre las cepas evaluadas. Como se esperaba, el crecimiento de las células que expresaban la proteína silvestre, se vio claramente afectado (**Figura 26**). Las células que expresaron Kid con mutaciones en residuos catalíticos (D75E, D75N, R73H y H17P), crecieron de manera normal, sin aparentes efectos de estas proteínas en la viabilidad de celular (**Figura 26**). Las proteínas KidA55G y KidT69G, mostraron un efecto similar en la inhibición del crecimiento, a pesar de sus diferencias en el potencial de inhibición de síntesis de proteínas (**Figura 25**). Además, se observó que sus efectos sobre la viabilidad celular fueron superiores a los encontrados en la proteína silvestre (**ver Discusión**). Se encontró una situación muy diferente en el caso de la proteína KidR85W. Esta mutación, que afectaba drásticamente la unión al ARN (**Figura 17**), produce una proteína incapaz de inhibir el crecimiento celular, tal y como se había descrito anteriormente (Santos-Sierra y col., 2003). Las proteínas KidT46G y KidT46G/T69G no afectaron al crecimiento celular o a la viabilidad (**Figura 26**), resultados que son consistentes con los datos anteriores (**Figuras 17, 18, 22 y 25**). El doble mutante KidA55G/T69G mostró un efecto menor sobre el crecimiento celular, en comparación con cada uno de los mutantes sencillos, KidA55G y KidT69G.



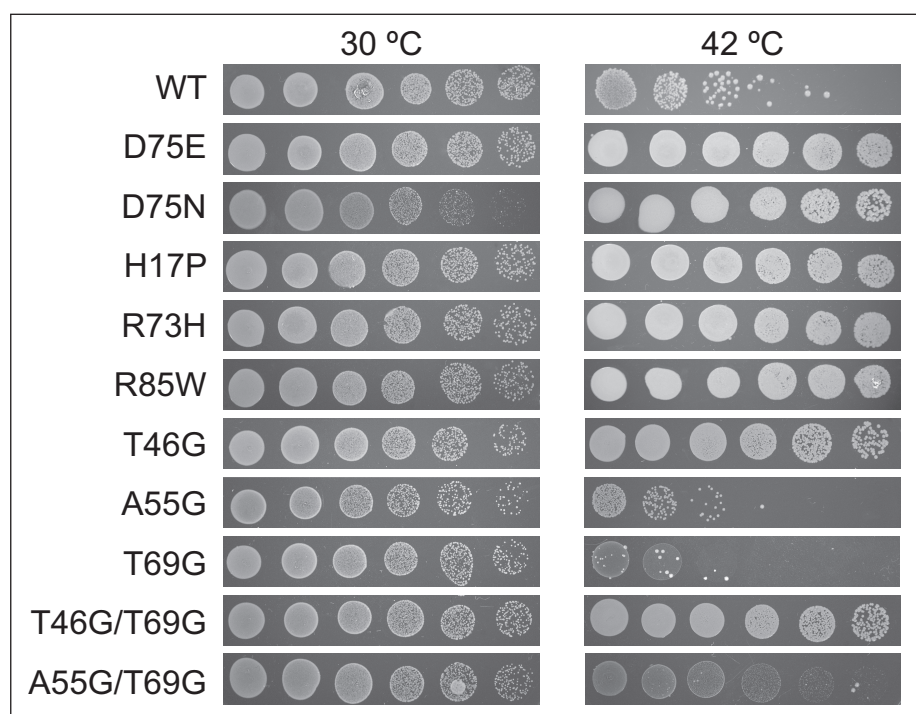


Figura 26.- Cultivabilidad de las diferentes cepas conteniendo las proteínas Kid mutante y silvestre. OV2 conteniendo los derivados de pBR1120 o pAB1120 codificando las proteínas Kid silvestre o los diferentes mutantes fueron crecidas, a 30 °C, hasta fase exponencial ( $A_{600} \sim 0,35$ ). Volúmenes iguales de diluciones seriadas de los cultivos, fueron sembrados en placas conteniendo los antibióticos apropiados para cada vector (tetraciclina 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  o kanamicina 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Se muestra el crecimiento de los cultivos sembrados e incubados durante 16 horas a 30 °C o a 42 °C.

Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en los ensayos de corte del ARN y de inhibición de síntesis de proteínas (**Figuras 17, 18, 22 y 25**), e indican que la actividad ARNasa está a la base del efecto antiproliferativo de la toxina.

## 2 IMPLICACIÓN DE LA TOXINA KID EN EL PROCESO DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

### 2.1 Aislamiento de mutantes cromosómicos resistentes a la toxina Kid.

Como consecuencia de su actividad ARNasa, la toxina Kid es capaz de inhibir la síntesis de proteínas en procariotas y eucariotas (de la Cueva-Mendez y col., 2003, Munoz-Gomez y col., 2005). La obtención casual de nuevos mutantes en el factor de terminación RF1, abrió la posibilidad de explorar la participación de este componente de la maquinaria de traducción en la “ruta” de toxicidad de Kid. Los precedentes de esta línea de estudio y los resultados que indican que existe efectivamente una conexión funcional entre las actividades de Kid y RF1, se resumen en esta sección.

Durante la búsqueda de la diana de acción de la toxina Kid, en nuestro laboratorio se intentaron buscar mutantes cromosómicos de *E. coli* que fueran resistentes a su actividad citotóxica. Para ello, el Dr. Marc Lemonnier utilizó una selección doble de mutantes basado en el trabajo de Bernard y Couturier (Bernard y Couturier, 1992). En dicho trabajo se aislaron mutaciones en el gen *gyrA* que codifica para la subunidad A de la girasa, que es a su vez la diana bacteriana de la toxina CcdB del sistema toxina-antitoxina *ccd* del plásmido F.

Para la búsqueda de mutantes cromosómicos resistentes a Kid, se emplearon dos plásmidos, pKK1120 y pAB1120. Estos plásmidos confieren resistencia a tetraciclina y kanamicina, respectivamente. Ambos plásmidos contienen el operón *parD* (*kis-kid*) con la mutación *kis74* (codón UAG, ámbar) en la antitoxina y el gen *kid* silvestre (**Tabla 3**). En ausencia de supresión se sintetiza una antitoxina truncada e inactiva y, por lo tanto, se produce una inhibición de la formación de colonias mediada por Kid. En consecuencia, células que sobreviven a esta inhibición podrían contener, entre otras, mutaciones en posibles dianas cromosómicas de la toxina. En aquel momento no se había determinado que Kid poseía actividad ARNasa, por lo que la posibilidad de aislar mutantes cromosómicos resistentes a Kid no era descartable. En una primera ronda de selección, se trataron las células de *E. coli* (MC1061) con el mutágeno 2-aminopurina, y se transformaron con el plásmido pKK1120 aislando supervivientes a la acción de la toxina en presencia de tetraciclina, marcador de selección del recombinante. Para aumentar el número de resistentes potenciales a Kid, se llevó a cabo una segunda ronda de selección, al transformar un cultivo de las células supervivientes con el plásmido pAB1120 y seleccionar de nuevo resistentes a la toxina en presencia de kanamicina, marcador de resistencia de dicho plásmido. Para descartar posibles mutaciones que afectaran al gen *kid* o a sus elementos reguladores presentes en el plásmido, se ensayó la toxicidad de los plásmidos residentes (pKK1120 o pAB1120) extrayendo el ADN plasmídico y retransformando a nuevas células de *E. coli* silvestres. Los mutantes que exhibieron crecimiento en presencia de un plásmido tóxico fueron caracterizados.

Las mutaciones fueron mapeadas en una región del cromosoma de *E. coli* situada entre los minutos 22 y 32, usando una colección de diferentes cepas Hfr-Tn10. Para afinar la

localización genética de las mutaciones, las cepas mutantes fueron usadas como receptoras en experimentos de transducción con P1, usando diferentes cepas donantes que llevaban inserciones del transposon Tn10 a intervalos regulares en el cromosoma entre los minutos 22 y 32. Para uno de los mutantes se observó que el fenotipo de resistencia al plásmido pAB1120 se perdía con una alta frecuencia en transductantes resistentes a tetraciclina, obtenidos utilizando un lisado de P1 crecido en células con el transposon Tn10 (Tet) en la posición 26,61 minutos. Para aislar el gen mutante, se generaron fragmentos del cromosoma de la cepa mutante (de aquí en adelante KR19) por digestión con la enzima de restricción *Sau3A*. Estos fragmentos se clonaron en un plásmido mini-F de bajo número de copias, pMLM1 (Lemonnier y col., 2000). Se transformaron células de *E. coli* con esta librería y se volvieron a transformar con el plásmido pAB1120. Los plásmidos mini-F que llevaban fragmentos que conferían resistencia a pAB1120, fueron aislados y sus insertos cromosómicos fueron secuenciados. Tras la secuenciación se comprobó que todos los fragmentos contenían una región cromosómica que incluía el gen *prfA*, que codifica el factor de terminación de la traducción RF1. Este gen se localiza en el cromosoma de *E. coli* a los 27,2 minutos, lo que es consistente con los resultados del mapeo con las cepas Hfr.

Posteriormente, se procedió a secuenciar la región de *prfA* de los mutantes aislados y en todos los casos se detectaron mutaciones en el gen *prfA*. Se eligieron 4 mutantes independientes para continuar su evaluación: KR2, KR4, KR17 y KR19. El análisis de las secuencias reveló que las mutaciones consistieron en transiciones G-C o A-T, esperables por el tratamiento mutagénico con 2-aminopurina (Ronen, 1980). Se encontró que las cepas KR2 y KR19 contenían la misma mutación, *prfA301*, que producía el cambio del aminoácido glicina a serina en la posición 301 del RF1. La cepa KR4 llevaba la mutación *prfA303*, en la que el aminoácido arginina en la posición 303 se sustituía por serina. Para finalizar, la cepa KR17 contenía la mutación *prfA121*, que sustituía la glicina en la posición 121 de RF1 por serina. Estos mutantes fueron el punto de partida para los resultados obtenidos durante la realización del trabajo experimental de esta tesis y que se presentan en este capítulo.

### **2.2 Los mutantes *prfA* sólo pueden complementar una mutación *prfA(ts)* si están sobreexpresados.**

Se intentó analizar si los mutantes *prfA* aislados estaban afectados en su actividad terminadora de la traducción *in vivo*. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de complementación usando un mutante de *E. coli* termosensible, MRA8 *prfA1(ts)* (Ryden y Isaksson, 1984, Zhang y col., 1994). Esta cepa, que permite estudiar la complementación de la mutación analizando la recuperación del crecimiento a 42 °C, fue transformada con los plásmidos derivados de pBAD18, pELI01, pELI02, pELI03 y pELI04, que contenían las diferentes variantes del gen *prfA* (*prfA121*, *prfA* silvestre, *prfA301* y *prfA303*, respectivamente). La expresión de dichos genes se encontraba bajo control del promotor *Para*, inducible por arabinosa (Guzman y col., 1995).

MRA8 también fue transformada con el plásmido pBAD18 como control.

En ausencia de arabinosa, es decir con los niveles de expresión basal del promotor, el alelo *prfA* silvestre expresado desde pELI02 fue capaz de complementar la mutación *prfA1(ts)* a la temperatura no permisiva de 42 °C. Ninguno de los nuevos mutantes aislados y expresados a nivel basal fue capaz de producir la misma complementación (Figura 27A).

Cuando la expresión de los alelos *prfA* fue inducida, añadiendo arabinosa al medio, se vio que el crecimiento de la cepa MRA8 a 42 °C se recuperaba en todos los mutantes evaluados (Figura 27B).

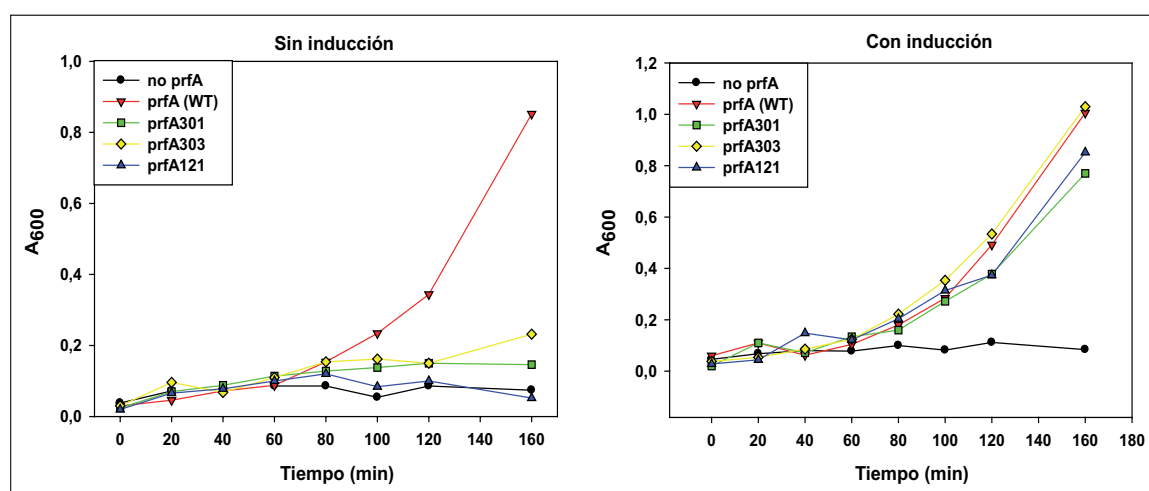


Figura 27.- Ensayos de complementación de una mutación *prfA* termosensible. La cepa MRA8 fue transformada con los plásmidos pELI01 (*prfA121*), pELI02 (*prfA* silvestre), pELI03 (*prfA301*), pELI04 (*prfA303*). La expresión de los alelos *prfA* en los plásmidos estaba bajo control del promotor Para inducible por arabinosa. A) Los cultivos sin inducir fueron crecidos a 42 °C durante 160 minutos. B) Ensayo similar pero añadiendo arabinosa (concentración 1% final) al medio para inducir la expresión de los diferentes alelos. El efecto de la expresión de los alelos *prfA* sobre el crecimiento celular de la cepa MRA8, se siguió midiendo la absorbancia de los cultivos a 600 nm.

La restauración del crecimiento de la cepa MRA8 por complementación, indica que las mutaciones disminuyen pero no suprimen totalmente la eficiencia de terminación de traducción de los diferentes RF1.

### 2.3 La disminución de la terminación de la traducción *in vivo* conduce a la lectura a través de los codones de terminación en el proceso de traducción (*readthrough*).

Las mutaciones citadas anteriormente en el alelo *prfA*, afectan al factor de terminación de la traducción RF1, que reconoce específicamente los codones de terminación UAG y UAA. Una posible explicación para el fenotipo de resistencia a Kid encontrado en estos mutantes, sería una lectura a través de la mutación ámbar (UAG) del alelo *kis74* que se encuentra en los plásmidos pKK1120 y pAB1120. Este hecho permitiría la síntesis de una antitoxina, Kis, de tamaño completo, que neutralizaría la actividad tóxica de Kid, ya que el codón de terminación normal de la antitoxina es UGA que es reconocido por el factor de terminación RF2 y no por



RF1, y por lo tanto se terminaría su traducción de modo normal.

Para valorar esta posibilidad, se transformaron células de *E. coli* silvestres (MC1061) y mutantes *prfA* (KR19) con los plásmidos pELI05 y pELI06 que contienen los alelos *kis* y el mutante *kis74*, respectivamente, bajo control del promotor inducible *Para* dependiente de arabinosa, del plásmido pFUS2 (Guzman y col., 1995). Tras inducir la expresión de los alelos *kis* en los cultivos, se prepararon extractos celulares y se analizaron por *Western Blot* utilizando anticuerpos anti-Kis (**Figura 28**). Se detectó una banda correspondiente a la proteína Kis de tamaño completo en las células silvestres y KR19 que llevaban el plásmido pELI05 (*kis*). Esta banda no estaba presente en los lisados de las células silvestres conteniendo el plásmido pELI06 (*kis74*), que produce una proteína Kis de menor tamaño debido a la terminación de la traducción el codón ámbar en la posición 74. Dicha proteína de menor tamaño no pudo detectarse bien ya que co-migraba con una banda inespecífica de tamaño inferior a Kis presente en todas las muestras (**Figura 28**).

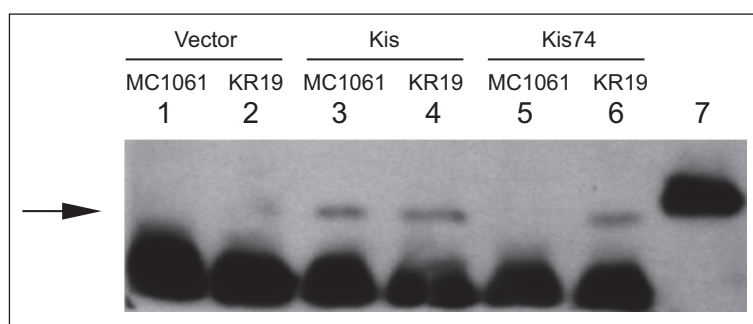


Figura 28.- Lectura a través de la mutación ámbar *kis74* en la cepa KR19 *in vivo*. Se llevaron a cabo análisis de *Western blot* usando diferentes extractos celulares (ver Métodos 2.10). La flecha negra indica la proteína Kis de tamaño completo. Los carriles 1, 3 y 5 muestran las inmunodetecciones de Kis en extractos celulares de la cepa silvestre, MC1061, conteniendo los plásmidos pFUS2 (vector), pELI05 (*kis*) y pELI06 (*kis74*), respectivamente. Los carriles 2, 4 y 6 muestran los extractos celulares de la cepa KR19 con los plásmidos pFUS2, pELI05 y pELI06, respectivamente. El carril 7 indica la proteína Kis con cola de histidinas. La banda ancha en la parte de abajo del gel es un producto de inmunodetección inespecífico presente en todos los lisados celulares.

La cepa KR19, conteniendo el plásmido pELI06 (*kis74*), produjo la lectura a través del codón de terminación UAG en posición 74, dando lugar a una proteína Kis de mayor tamaño, posiblemente una proteína de tamaño completo, ya que el codón de terminación natural de esta toxina, UGA, es reconocido por RF2. Se obtuvieron resultados similares con el mutante KR17 (datos no mostrados).

*Estos datos indican que las mutaciones en prfA disminuyen la eficiencia de terminación de la traducción in vivo mediada por RF1 en los codones de terminación UAG.*

## 2.4 Las mutaciones en *prfA* reducen la actividad de terminación específica de RF1 en los codones UAG.

Los resultados anteriores sugirieron que las cepas mutantes *prfA*, KR4, KR17 y KR19, poseían deficiencias en la actividad de terminación de la traducción en codones de terminación UAG. El grupo del Prof. Richard Buckingham del Instituto Pasteur (IBQF) de París, llevó a cabo, en colaboración, estudios sobre la actividad de terminación de la traducción de los distintos mutantes *prfA* en codones de terminación UAG, con diferentes secuencias adyacentes a los mismos.

Para evaluar las deficiencias en la terminación de la traducción, se recurrió a un sistema descrito por Curran y Yarus (Curran y Yarus, 1989) que, posteriormente, fue desarrollado por Poole y colaboradores para producir un ensayo preciso de terminación (Poole y col., 1995). Dicho sistema se basa en la competición que existe entre la terminación de la traducción y el cambio del marco de lectura ribosómico consecuencia de la presencia de un sitio de cambio de marco de lectura en el gen *prfB* de *E. coli*, que codifica el factor de terminación RF2. En este sitio, existe un codón de terminación UGA dentro del marco de lectura del ARN mensajero. En este caso, es posible que continúe la traducción evitando el codón de terminación, ya que se podría producir un cambio del marco de lectura ribosómico, +1, que es estimulado por la presencia de una secuencia Shine-Dalgarno que precede en 6 nucleótidos al codón de terminación. En el ensayo, se utiliza un plásmido que contiene dicho sistema, en donde la ventana de cambio del marco de lectura está fusionada al final del gen *malE* (**Figura 29A**). Cuando se produce la terminación de la traducción se origina una proteína de 43,9 kDa, mientras que el cambio del marco de lectura da lugar a una proteína de 52,0 kDa, al fusionarse con la traducción del gen *lacZ* (**Figura 29A**). Estas proteínas se separan por SDS-PAGE y se detectan por *Western blot*, mediante la unión de un anticuerpo anti-MalE y su posterior interacción con la proteína A marcada con <sup>125</sup>I. Las proteínas producidas se detectan mediante autorradiografía. El porcentaje entre el producto resultante de la terminación de la traducción y el producto del cambio del marco de lectura, puede cuantificarse y es una medida de la eficiencia de la terminación en diferentes señales de terminación o en diferentes cepas.

Se comprobó la actividad de las cepas mutantes *prfA* en los codones de terminación de la traducción UAG en dos contextos: UAGA y UAGU. Ambos contextos son más desfavorables que la señal más común de terminación de la traducción UAG, UAGG. Los ensayos de *Western blot* se muestran en la **figura 29B**, mientras que las constantes relativas entre la terminación y el cambio de marco de lectura se muestran en la **tabla 7**. La sobreproducción de las proteínas de fusión en las cepas *prfA* mutantes dio lugar a una inhibición del crecimiento por razones desconocidas, lo que explicaría la menor cantidad de proteínas de fusión encontrada en dichas cepas; se produjo un efecto inhibitorio mayor con la fusión que contenía la secuencia UAGA. Los valores de eficiencia de terminación encontrados en la cepa silvestre, MC1061, fueron similares a los anteriormente descritos por Poole y colaboradores (Poole y col., 1995), pero

## Resultados

inferiores a los encontrados por Mora y colaboradores en otras cepas de *E. coli* K12 (Mora y col., 2007). Hay que tener en cuenta que MC1061 es una cepa dependiente de estreptomycin, crecida en presencia de este antibiótico, lo que podría influenciar los parámetros cinéticos de la traducción y de su terminación. En la **tabla 7 (líneas 1-2)** se muestra que los valores de terminación de las tres cepas mutantes en las señales UAGA y UAGU, están reducidos un orden de magnitud aproximadamente respecto a la cepa silvestre.

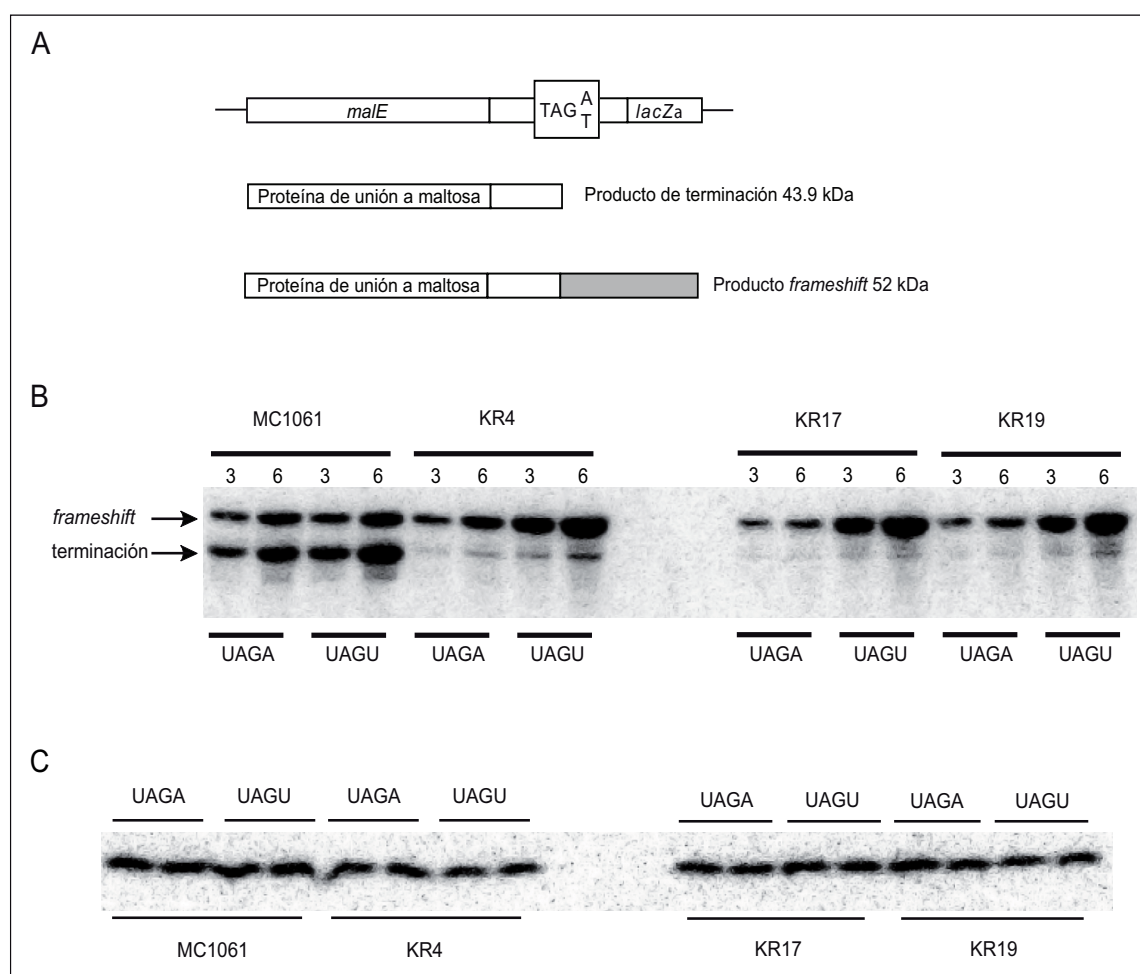


Figura 29.- Eficiencia y niveles del RF1 en las cepas mutantes en *prfA* *in vivo*. La terminación de la traducción se midió por su competición con el cambio de marco de lectura en el sitio presente en el gen *prfB* de *E. coli* (Poole y col., 1995). A) Se fusionó al gen *malE*, presente en un plásmido bajo control del promotor *Ptac*, una región de 23 nucleótidos del gen *prfB* alrededor del sitio de cambio del marco de lectura. El cambio del marco de lectura (+1) del ribosoma parado en la señal de terminación que se encuentra en fase, permite que la traducción continúe en una secuencia derivada del gen *lacZ*. La señal de 4 nucleótidos silvestre TGAC, fue reemplazada por las secuencias TAGA o TAGU. B) La producción de las proteínas de fusión derivadas de *MalE* fue inducida con IPTG durante 2 horas *in vivo* en la cepa parental MC1061 y en las mutantes KR4, KR17 y KR19. Las proteínas producto de la terminación o del cambio de lectura presentes en 3 ó 6 µl del extracto celular se separaron en SDS-PAGE y se visualizaron por *Western blot* con anticuerpos anti-*MalE* y proteína A marcada con  $^{125}\text{I}$ . C) Se determinaron las cantidades de RF1 en la cepa silvestre y en las mutantes mediante la cuantificación de los *Western blot* con anticuerpos anti-RF1 y proteína A marcada con  $^{125}\text{I}$ .

Tabla 7.-Eficiencia de terminación en codones UAG y cantidades de RF1 en las cepas *prfA* mutantes. Los datos se obtuvieron por cuantificación de los *Western blot* iguales a los mostrados en la figura 20. La eficiencia de terminación en las señales de parada UAGA y UAGU se expresa relativa al cambio de marco de lectura +1 de la ventana de cambio de marco derivada del factor RF2. La cantidad de RF1 en las cepas mutantes fue determinada mediante autorradiografía utilizando anticuerpos anti-RF1 y proteína A radiactiva, y expresada como porcentaje de la obtenida en la cepa silvestre MC1061.

	MC1061	KR4	KR17	KR19
Mutación RF1	-	R303H	G121S	G301S
Eficiencia de terminación en UAGA	1,30	0,18	0,15	0,14
Eficiencia de terminación en UAGU	1,42	0,16	0,06	0,12
Cantidad relativa de RF1	100	80	85	85

Existen dos mecanismos que podrían explicar estos resultados. Por una parte, las mutaciones podrían estar afectando a la estabilidad del RF1, lo que daría lugar a una fuerte reducción de la cantidad de RF1 en la célula. Por otra parte, la actividad de la proteína podría estar reducida en comparación al RF1 silvestre. Para resolver esta cuestión, se comparó la cantidad de RF1 presente en las cepas *prfA* mutantes con la presente en la cepa silvestre mediante ensayos de *Western blot*, usando anticuerpos anti-RF1.

Los resultados mostraron que la reducción de la cantidad de RF1 en las cepas mutantes fue bastante modesta (15-20 %) (**Tabla 6**), valor que es insuficiente para explicar el descenso en un orden de magnitud en la eficiencia de terminación en las cepas mutantes; en consecuencia, la mayor parte de este descenso se debería a una reducción de la actividad de estos factores.

El reducido descenso de la cantidad de RF1 encontrado en las cepas mutantes sugiere que dichas cepas no están especialmente afectadas en su estabilidad respecto a la proteína silvestre. Esta conclusión, sin embargo, sería inválida si existiera un mecanismo de autocontrol de los niveles de RF1 en las células, es decir, que una menor actividad del factor de terminación diera lugar a un aumento de la síntesis del RF1. Este tipo de autocontrol existe en el caso del RF2 de *E. coli* en alrededor del 70 % de los microorganismos cuyo genoma está secuenciado (Baranov y col., 2002). Dicho sistema de autocontrol se basa en la competición entre la terminación y el cambio de marco de lectura, que ha sido usado previamente para cuantificar la eficiencia de terminación.

El gen *prfA* se expresa desde el promotor del gen localizado anteriormente, *hemA*. Se ha sugerido con anterioridad que *E. coli* y *Samonella sp.* podrían poseer un mecanismo de autocontrol para la síntesis de RF1 que sería dependiente de la lectura a través de la señal de terminación débil de 4 nucleótidos UAGC del gen *hemA*, acoplado a la existencia de un lugar de unión del ribosoma sub-óptimo para la expresión de *prfA* (Elliott, 1989). La hipótesis sugiere que la síntesis del RF1 dependería en gran medida de los ribosomas que leen a través de la señal de terminación de la traducción del gen *hemA*, y, por lo tanto, traducen la región

intergénica, finalizando la traducción justo antes del codón de iniciación de *prfA*. De este modo, el proceso de traducción de RF1 comienza sin disociarse el ribosoma del ARN mensajero.

Para comprobar esta hipótesis, se construyeron fusiones traduccionales con *lacZ* desde la región promotora de *hemA* hasta el codón 13 del gen *prfA*, que eran análogas a las descritas por Dahlgren y Ryden-Aulin (Dahlgren y Ryden-Aulin, 2004). Se estudiaron los efectos en la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa de la señal de terminación de *hemA* en presencia de el factor RF1 silvestre o introduciendo las mutaciones en el RF1. Los resultados mostraron que incluso con las mutaciones de RF1 descritas anteriormente, se sintetiza poca cantidad de RF1 debido a este mecanismo en *E. coli* (L. Mora, datos no publicados).

*De este modo, los niveles de RF1 detectados reflejan fundamentalmente un efecto de las mutaciones aisladas en la actividad de RF1 y no en la estabilidad o regulación de los niveles de esta proteína.*

### 2.5 Las mutaciones en el gen *prfA* confieren hipersensibilidad a las toxinas Kid y RelE.

En trabajos previos se mostró que RF1 ejercía un efecto protector del corte del ARN por la toxina RelE *in vitro* (Pedersen y col., 2003); por ello, se pensó que las cepas mutantes en el RF1 deberían responder de manera diferencial a la toxina RelE *in vivo*, en comparación con la cepa parental MC1061. Esto sería así si las cepas mutantes no tuvieran mutaciones compensadoras en la toxina RelE que anularan su toxicidad. Para verificar esta última opción, se procedió a extraer el gen *relE* cromosómico de estas cepas mutantes, amplificarlo por PCR y, posteriormente, secuenciarlo. En ninguna de las cepas se encontraron mutaciones que afectaran el gen *relE*. Por lo tanto, las cepas mutantes podrían mostrar una sensibilidad diferencial a la toxina RelE.

Para el análisis de la sensibilidad de estas cepas a la toxina RelE, se eligió realizar el estudio con la cepa mutante *prfA*, KR19, que mostró, en general, una eficiencia de terminación de la traducción menor que las otras dos cepas (**ver Tabla 7**).

Se expresó el gen *relE* en la cepa *prfA* mutante, y se compararon los niveles de citotoxicidad con los alcanzados en el fondo silvestre de *E. coli*. Ya que la actividad ARNasa de Kid, a diferencia de la de RelE, es independiente de la traducción, se decidió analizar los niveles de toxicidad de Kid en los mutantes *prfA* como control negativo.

La **figura 30** muestra los efectos citotóxicos de ambas toxinas, Kid y RelE, tanto en la cepa silvestre MC1061 como en la cepa mutante KR19. Estas cepas llevan los plásmidos pNDM220 (vector), pSS100 (*kid*) o pELI07 (*relE*). Los paneles A y D muestran el crecimiento de ambas cepas en ausencia de inducción de la expresión de las toxinas, donde se observa que dicho crecimiento no está afectado. La inducción parcial de las toxinas Kid y RelE, en condiciones de concentración del inductor IPTG sub-óptimas (100  $\mu$ M), solo produjo inhibición del crecimiento en la cepa mutante *prfA* y no en la cepa silvestre MC1061 (**Figura 30, panel B, comparar líneas**



4 y 6 con líneas 3 y 5). Esto sugería que la cepa KR19 mostraba hipersensibilidad a ambas toxinas. Cuando esta cepa fue transformada con el plásmido pELI08, que contiene el gen *prfA* silvestre, se recuperó una sensibilidad a las toxinas similar a la de la cepa silvestre (**Figura 30, panel C, líneas 3-6**). Este resultado sugiere un efecto específico de la mutación en *prfA* en la hipersensibilidad a las toxinas. La inhibición del crecimiento debida a Kid y a RelE que se detectó en la cepa mutante *prfA*, se neutralizó cuando los genes de sus antitoxinas, *kis* y *relB*, fueron sobreexpresados en *trans* (**Figura 30, panel E, líneas 3-6**).

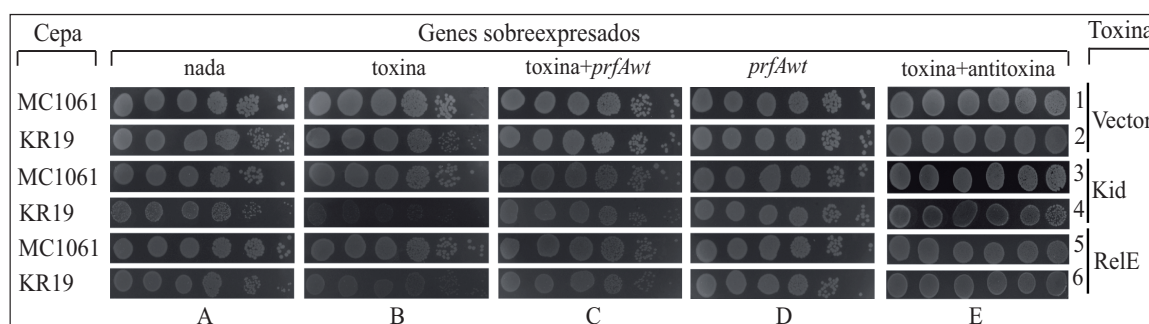


Figura 30.- Hipersensibilidad de la cepa mutante *prfA* KR19 a las toxinas Kid y RelE y su neutralización por la sobreexpresión de los genes de sus respectivas antitoxinas o de *prfA* silvestre. Se crecieron las cepas silvestre y mutante *prfA* KR19, llevando el vector plasmídico pNDM220 (líneas 1-2), o los derivados codificando las toxinas Kid, pSS100 (líneas 3-4) y RelE, pELI07 (líneas 5-6), hasta fase exponencial ( $A_{600} \sim 0,4$ ) en medio LBT. Se hicieron diluciones seriadas de los diferentes cultivos y se sembraron en placas de LBT-agar (diluciones seriadas 1/10 de izquierda a derecha). Los paneles B y C, muestran el crecimiento de las diferentes estirpes cuando se incluyó IPTG (100  $\mu$ M) en las placas para inducir la expresión de las toxinas Kid y RelE desde los plásmidos. Los paneles A y D, muestran el crecimiento al omitir el IPTG, es decir, en ausencia de inducción de la expresión de las toxinas. Se incluyeron controles de especificidad al transformar las células con pELI08 (*prfA* silvestre) (paneles C y D) o con los plásmidos que codifican las antitoxinas de Kid y RelE, llamados pELI05 (*kis*) y pELI09 (*relB*) (panel E). El crecimiento en cada muestra se analizó después de incubar las placas durante 18 horas a 30 °C.

*La combinación de todos estos datos implica una relación funcional específica entre RF1 no sólo con la toxina RelE sino también con Kid.*

Tanto la toxina RelE como Kid muestran actividad inhibidora de la síntesis de proteínas. Por lo tanto, evaluamos el efecto de dichas toxinas en la síntesis de proteínas *de novo* en la cepa *prfA* mutante y en la cepa silvestre, en condiciones de inducción subóptima de las toxinas, de manera similar a lo realizado anteriormente. Los resultados indican que tanto Kid como RelE inhiben la síntesis de proteínas en la cepa mutante *prfA* pero no en la silvestre (**Figura 31**). La inhibición de la síntesis de proteínas mediada por Kid y RelE fue neutralizada cuando se expresaron los genes de sus respectivas antitoxinas, *kis* y *relB*, indicando que el efecto en la síntesis de proteínas es específico de la actividad de las toxinas. La protección por RF1 en este experimento fue menos eficiente (datos no mostrados); esto podría reflejar una interacción más específica de las toxinas con sus respectivas antitoxinas.

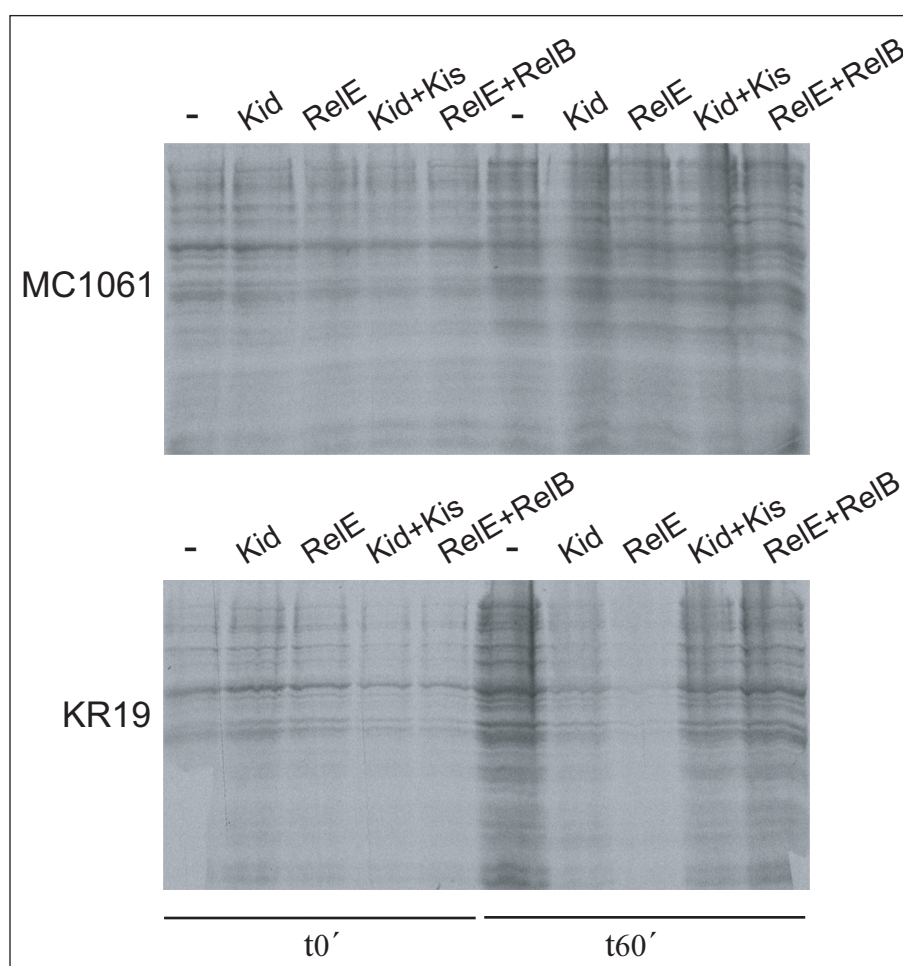


Figura 31- Inhibición de la síntesis de proteínas *in vivo* por las toxinas Kid y RelE. Las cepas MC1061 (panel de arriba) y KR19 (panel de abajo) fueron transformadas con los plásmidos tal y como se indica en cada carril: -) vector plasmídico pNDM220; Kid) pSS100 (*kid*); RelE) pELI07 (*relE*); Kid+Kis) pSS100 (*kid*) y pELI05 (*kis*); RelE+RelB) pELI07 (*relE*) y pELI09 (*relB*). La expresión de los genes de las toxinas y de las antitoxinas, se llevó a cabo añadiendo al medio IPTG (100  $\mu$ M) y arabinosa (0,5 %), respectivamente. Las proteínas sintetizadas durante 10 minutos a los tiempos 0 ó 60 minutos tras la inducción de las toxinas y antitoxinas, se fraccionaron por SDS-PAGE (12,5 %), y se identificaron por autorradiografía tal y como se indica en **Métodos 2.6.3**.

*La mayor eficiencia en la inhibición de síntesis de proteínas por las toxinas Kid y RelE en el mutante *prfA* es consistente con el mayor efecto citotóxico mostrado.*

Se quiso evaluar si la hipersensibilidad de las cepas *prfA* mutantes dependía de la actividad ARNasa de la proteína Kid. La **figura 32** muestra los datos obtenidos cuando se ensayó la toxicidad de las cepas silvestre MC1061 y mutante KR19, llevando los plásmidos pFUS2, pFUSKid (*kid*) y pFUSH17P (*kidH17P*); la mutación *kidH17P*, previamente caracterizada impide la actividad ARNasa de Kid (**Resultados 1**). En estos plásmidos los genes de las proteínas están bajo control del promotor *Para*. Para reprimir la expresión de dicho promotor se usó glucosa al 0,2 %, mientras que para poder observar la hipersensibilidad, se jugó con el escape basal que presenta este tipo de promotor. Así, se hicieron diluciones seriadas de los cultivos

y se sembraron en placas con el antibiótico kanamicina y glucosa al 0,2 %, o bien solo con el antibiótico. Se puede apreciar que la hipersensibilidad, detectada por un peor crecimiento de las colonias, no se pudo observar cuando la toxina Kid carece de su actividad ARNasa.

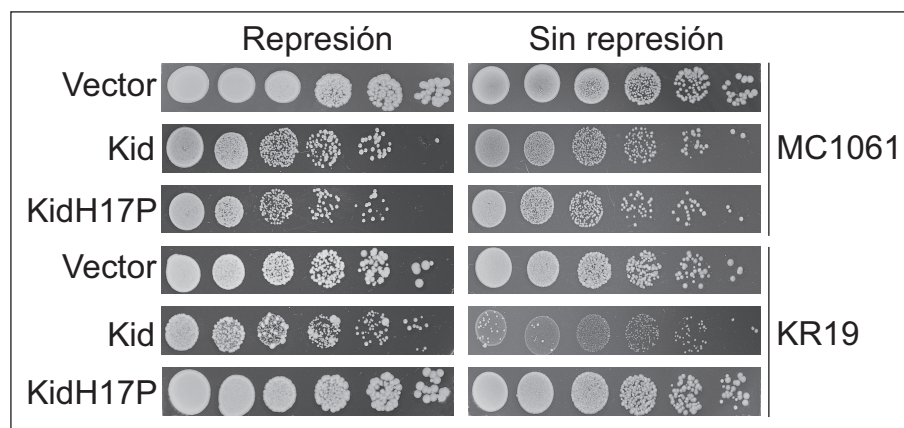


Figura 32.- Toxicidad de las proteínas Kid y KidH17P en las cepas silvestre MC1061 y mutante *prfA* KR19. Se crecieron hasta fase exponencial,  $A_{600} \sim 0,4$  en medio LBT, las cepas silvestre y *prfA* mutante KR19, llevando el vector plasmídico pFUS2 (Vector), o los derivados codificando los genes de las toxinas Kid (*kid*) y KidH17P (*kidH17P*). Se hicieron diluciones seriadas de los diferentes cultivos y se sembraron en placas de LB-agar con kanamicina (diluciones seriadas 1/10 de izquierda a derecha). La represión del promotor se llevó a cabo incluyendo glucosa al 0,2 % en el medio; la expresión basal del promotor se realizó en condiciones de ausencia del represor, glucosa 0,2 %.

En consecuencia, la hipersensibilidad observada a la toxina Kid en los mutantes *prfA* es dependiente de la actividad ARNasa de esta toxina.

## 2.6 Las mutaciones en *prfA* producen hipersensibilidad a los antibióticos aminoglicósidos.

La extra-sensibilidad a las toxinas en las cepas *prfA* mutantes podría ser una consecuencia indirecta de un estrés general en la maquinaria de traducción. Para evaluar dicha hipótesis, comparamos, en primer lugar, la sensibilidad de las cepas silvestre y mutantes a antibióticos que actuaban sobre el proceso de traducción, como por ejemplo cloranfenicol o tetraciclina, que son inhibidores de la actividad peptidil-transferasa y de la unión del aminoacil-ARNt, respectivamente (Hansen y col., 2003, Chopra y Roberts, 2001). También se evaluó la sensibilidad a diferentes aminoglicósidos como kanamicina, gentamicina y paromomicina. Esta familia de antibióticos actúa sobre el sitio A en la subunidad 30S del ribosoma interfiriendo con el reconocimiento codón-anticodón y con la translocación del ARNt entre los sitios A y P del ribosoma (Kotra y col., 2000). En todos los casos, los antibióticos se usaron a concentraciones que estaban próximas a su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), para evitar saturar el ensayo y poder detectar diferencias respecto a la cepa silvestre.

En la **figura 33** se muestran los resultados obtenidos: i) no se encontraron diferencias en la sensibilidad entre las cepas silvestre y mutantes en *prfA* cuando se ensayaron frente a los



antibióticos cloranfenicol y tetraciclina. Este hecho descarta que el incremento de sensibilidad a las toxinas Kid y RelE fuera una consecuencia circunstancial de un estrés general en el proceso de traducción, provocado por las mutaciones en *prfA*; ii) la cepa mutante mostró una mayor sensibilidad, en comparación con la cepa silvestre, a kanamicina y a los otros aminoglicósidos ensayados. Este resultado de alguna manera era esperado, ya que dichos antibióticos interaccionan con una región que solapa con el dominio de interacción del RF1 (**ver discusión**).

Como control para evaluar posibles efectos inespecíficos de la mutación *prfA* en otros procesos celulares, se ensayaron otros antibióticos. Se utilizó ácido nalidíxico, que es un inhibidor de la enzima ADN girasa y que a su vez induce la respuesta SOS, inhibiendo la replicación del ADN; y rifampicina, que es un inhibidor de la ARN polimerasa bacteriana y que, por lo tanto, actúa a nivel de la transcripción. No se encontraron diferencias en la sensibilidad a estos antibióticos entre las cepas silvestre y mutante (**Figura 33**).

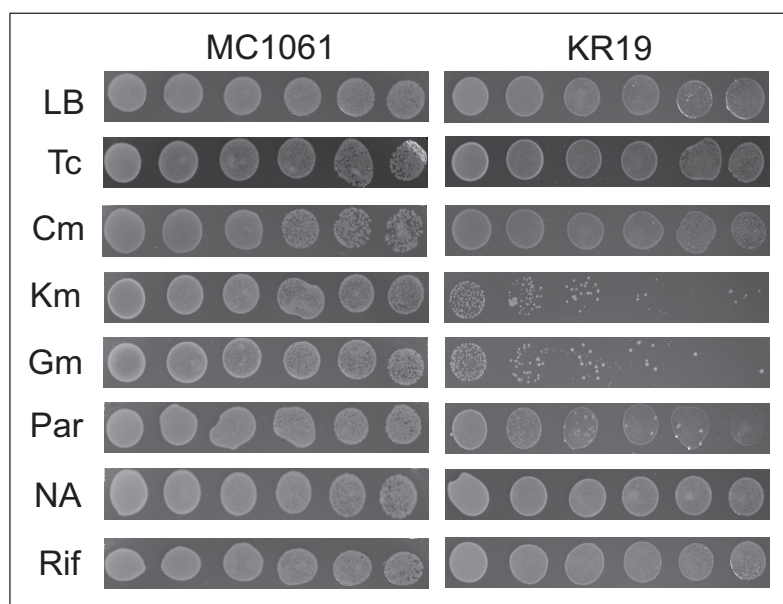


Figura 33.- Ensayos de sensibilidad a diferentes antibióticos de las cepas KR19 (*prfA303*) y silvestre, MC1061. Ambas cepas fueron crecidas a 30 °C hasta alcanzar una  $A_{600}=0,4$  en medio LBT. Se sembraron diluciones seriadas (pasos de  $10^{-1}$  de izquierda a derecha) en placas de LBT-agar suplementado con diferentes antibióticos: tetraciclina (Tc, 0,1 µg/ml), cloranfenicol (Cm, 0,5 µg/ml), kanamicina (Km, 1,0 µg/ml), gentamicina (Gm, 0,5 µg/ml), paromomicina (Par, 1,0 µg/ml), ácido nalidíxico (AN, 1,0 µg/ml) y rifampicina (Rif, 1,0 µg/ml). Los antibióticos se usaron a concentraciones cercanas a sus concentraciones mínimas inhibitorias. Las placas se incubaron a 30 °C durante 18 horas.

*Estos resultados confirman la especificidad del incremento de sensibilidad a las toxinas RelE y Kid y a antibióticos aminoglicósidos encontrada en estos mutantes.*

### 3 ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LA PROTEÍNA KID CON EL RIBOSOMA

#### 3.1 Kid produce roturas en el ARN ribosómico pero éstas no inactivan al ribosoma.

##### 3.1.1 KID CORTA ARN RIBOSÓMICO DE FORMA ESPECÍFICA

A la vista de los datos anteriores, parecía que Kid podría estar ejerciendo su acción en el contexto ribosomal, ya que el RF1 parece actuar en la ruta de toxicidad de esta proteína. Como Kid es una ARNasa, si existieran interacciones con el ribosoma, sería esperable que pudiera ejercer su acción sobre el ARN ribosómico.

En el laboratorio del Dr. Álvaro Martínez del Pozo se realizó el estudio del corte del ARN ribosómico por la toxina Kid. Para ello, se utilizaron ribosomas eucariotas de lisados de reticulocitos de conejo (Promega). Se añadieron al lisado de reticulocitos de conejo cantidades crecientes de la proteína Kid (50 ng, 100 ng y 200 ng) o de la proteína mutante KidH17P, y como control una mezcla Kid:Kis en una relación 1:1, utilizando las mismas cantidades de cada proteína citadas anteriormente (**ver Métodos 2.7.3**). Como control del corte específico del ARN ribosómico, se incluyó la ribotoxina  $\alpha$ -sarcina que corta el lazo SRL (*Sarcin Ricin Loop*) del ARN ribosómico 28S, dando lugar a un producto característico de dicho corte; el fragmento  $\alpha$ .

La **figura 34** muestra el gel de agarosa que resuelve los productos de corte. En el carril 2 se observa una banda que corresponde al fragmento  $\alpha$  derivado del corte del ARNr 18S por la  $\alpha$ -sarcina; en los carriles 3 a 5 se muestran los productos de corte generados por la actividad ARNasa de Kid. Se puede observar que el corte que produjo Kid no fue tan específico como el de la  $\alpha$ -sarcina, ya que se observaron varias bandas discretas que parecen provenir del corte del ARN ribosómico 18S, pues dicha banda desaparece al incubar con la proteína Kid. El corte, sin embargo, tiene especificidad ya que se observaron productos discretos de corte y no un degradado gradual característico de una degradación inespecífica. En el carril 3 se observa que la carga de muestra fue menor, ya que todas las bandas mostraron menor intensidad y permite observar dichas bandas con mayor claridad. Cuando la antitoxina Kis estuvo presente en las muestras, se vio su capacidad para impedir la actividad ARNasa de Kid, ya que no se observó la aparición de las bandas discretas. De igual manera cuando se utilizó la proteína mutante KidH17P, afectada en su actividad ARNasa (**Resultados 1**), se observó que tampoco aparecieron los productos derivados del corte, indicando que los cortes generados por la toxina Kid requieren de dicha actividad. Notar que este análisis no se realizó sobre ribosomas bacterianos debido a la menor eficiencia de corte de la  $\alpha$ -sarcina sobre este tipo de ribosomas.

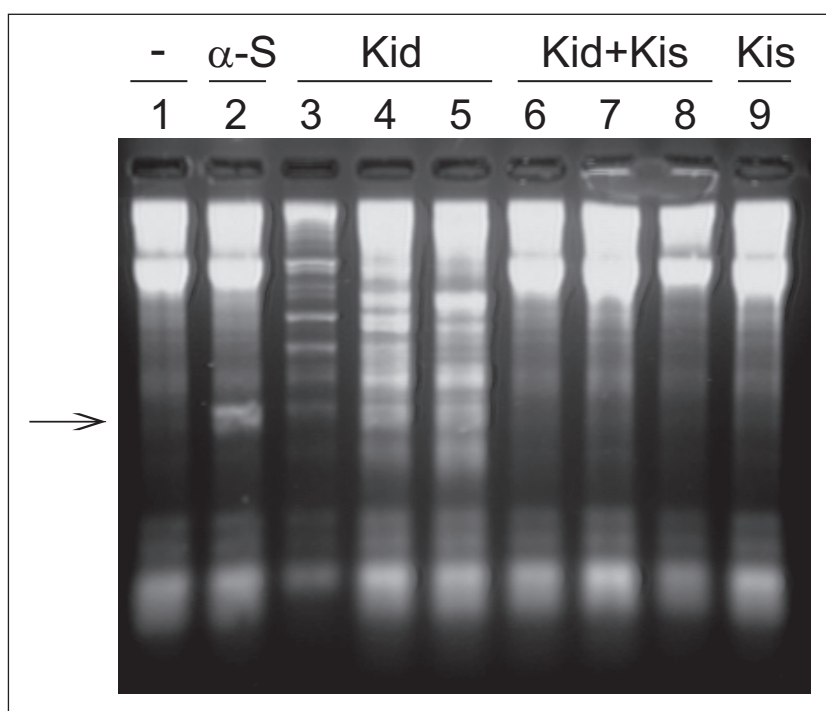


Figura 34.- Ensayo de la actividad ribonucleolítica de Kid sobre ribosomas eucariotas. En el carril 1 se muestran los ARNs ribosómicos intactos ya que no estuvieron en presencia de las proteínas Kid o  $\alpha$ -sarcina. El carril 2 muestra los ARNs ribosómicos tras la adición de 100 ng de  $\alpha$ -sarcina. Los carriles 3-5 muestran el resultado de la adición a los lisados de 50, 100 y 200 ng de Kid, respectivamente. Los carriles 6-8 muestran la neutralización de Kid por Kis utilizando cantidades iguales de ambas proteínas (50, 100 y 200 ng). Por último, el carril 9 muestra la ausencia de corte en el ARN ribosómico tras la adición de la 200 ng de proteína KidH17P. La flecha indica el fragmento  $\alpha$  derivado del corte de la  $\alpha$ -sarcina.

### 3.1.2 LOS CORTES DEL ARN RIBOSÓMICO POR KID NO INACTIVAN LA FUNCIONALIDAD DEL RIBOSOMA

Para evaluar la funcionalidad de los ribosomas tras los cortes producidos por Kid, se utilizó el sistema de síntesis de proteínas *in vitro* en extractos S30 de *E. coli* y en lisados de reticulocitos de conejo (ambos de Promega). Si el corte de Kid afectase a la funcionalidad de los ribosomas, tras la posterior inactivación de la toxina por Kis, la maquinaria de traducción estaría inactivada y no se podría sintetizar *in vitro* la proteína Luciferasa utilizada como proteína indicadora en este ensayo.

Para evaluar este posible efecto, se incubaron los lisados de reticulocitos de conejo y de *E. coli* con la proteína Kid a 0,3  $\mu$ M durante 20 minutos, tras los cuales se añadió un exceso de la proteína Kis (0,9  $\mu$ M). A continuación, se procedió a ensayar la capacidad del extracto así tratado, para sintetizar proteínas. El ensayo se realizó siguiendo el protocolo estándar que en extractos bacterianos se inicia con la adición del plásmido conteniendo el gen de la Luciferasa; este plásmido servirá como molde para la síntesis de dicha proteína, en un proceso en el que la traducción está acoplada a la síntesis del ARNm de la Luciferasa. En extractos de reticulocitos, la síntesis de proteínas se inicia con la adición del ARNm de la Luciferasa. Notar que la neutralización de la toxina por la antitoxina evita posibles interferencias debido al

procesamiento del ARNm de la Luciferasa, en ambos ensayos, por la actividad ARNasa de Kid. La **figura 35** muestra que, en los dos tipos de lisados celulares, Kid no produjo la inactivación de la maquinaria de traducción, ya que la posterior adición de Kis permitió la síntesis de la Luciferasa. La **figura 35A** muestra el resultado obtenido en los lisados de reticulocitos de conejo, mientras que la **figura 35B** muestra el mismo resultado pero en extractos S30 de *E. coli*. Como control negativo se omitió el ARN mensajero (en lisados de reticulocitos) o se añadió cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas en bacterias (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en extractos S30). Se tomó como control positivo el nivel de síntesis de proteínas en presencia del tampón de dilución de las proteínas. En ambos extractos no se produjo síntesis de Luciferasa cuando se añadió Kid a las muestras, indicando que la actividad ARNasa de la toxina inhibe la síntesis de proteínas. El ensayo mostró que en ambos extractos se produjo síntesis de Luciferasa cuando se añadió Kis tras los 20 minutos de incubación con la toxina, indicando que el corte del ARN ribosómico por la toxina Kid no había inactivado la maquinaria de síntesis de proteínas. En ambos extractos, último carril, se muestra que Kis no inhibe la traducción incluso a concentraciones de 0,9  $\mu\text{M}$ . La concentración usada (0,3  $\mu\text{M}$ ) fue superior a la utilizada en los ensayos de rotura del ARNr, en los que 50 ng de proteína equivalieron a una concentración de 84 nM.

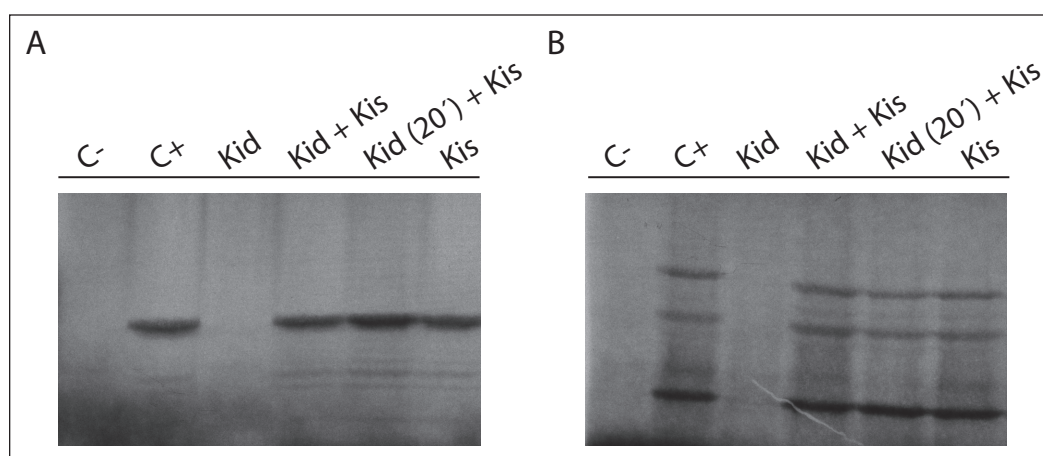


Figura 35.- Ensayo de inhibición de síntesis de proteínas mediado por Kid en eucariotas y procariotas. A) Eucariotas, lisado de reticulocitos de conejo, C-: control negativo, síntesis de proteínas en ausencia de ARN mensajero. B) Procariotas, extractos S30 de *E. coli*, C-: control negativo, síntesis de proteínas en presencia de cloranfenicol 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . En ambos casos, A) y B), Kid se añadió a 0,3  $\mu\text{M}$ . En el cuarto carril, [Kid (20') + Kis], los extractos se incubaron durante 20 minutos con la proteína Kid, tras los cuales se añadió Kis a 0,9  $\mu\text{M}$ . El último carril muestra el efecto de Kis a 0,9  $\mu\text{M}$ .

*Estos resultados indican que Kid corta ARN ribosómico, pero que los cortes no inactivan la maquinaria de traducción.*

### 3.2 Estudio de las interacciones de Kid con el ribosoma.

Los datos obtenidos anteriormente sobre la posible participación del RF1 en el mecanismo de acción de la proteína Kid y su capacidad para cortar el ARN ribosómico, podrían sugerir una interacción directa de Kid con el ribosoma. Los primeros resultados relativos a la evaluación de esta posible interacción se muestran en las siguientes secciones.

#### 3.2.1 ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES *IN VIVO* DE LA TOXINA KID CON EL RIBOSOMA

##### 3.2.1.1 Construcción de la proteína de fusión EYFP-Kid

Para estudiar las interacciones *in vivo* de Kid con el ribosoma se realizaron fusiones traduccionales de los genes *kid* y *eyfp*. El gen *eyfp* codifica la proteína EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), que es una variante amarilla-verde de la proteína silvestre GFP, cuyos máximos de excitación y de emisión son 513 y 527 nm, respectivamente. Para la fusión traduccional se utilizó el vector plasmídico pY104, que contiene el gen *eyfp* bajo el control del promotor *Para* (Nieto y col., 2006), el cual es inducible por arabinosa. Para producir la proteína de fusión se clonó *kid* en el extremo C-terminal de *eyfp*.

Para poder utilizar la proteína de fusión EYFP-Kid, fue necesario que la proteína fusionada conservara la actividad de ambas proteínas. Por una parte, la proteína EYFP-Kid debería ser capaz de emitir fluorescencia tras excitarla en su máximo de 513 nm y, por otra, la proteína Kid debería conservar la toxicidad asociada a su actividad ARNasa.

- Caracterización de la fluorescencia de la proteína EYFP-Kid

En primer lugar, se evaluó la capacidad de la proteína EYFP-Kid de emitir fluorescencia en comparación con la proteína silvestre EYFP. Para ello, se realizaron extractos de la cepa MC1061 conteniendo el vector plasmídico pFUS2, o los derivados pY104 (*eyfp*) o pELI10 (*eyfp-kid*). Tras diluir 1/100 los cultivos crecidos durante toda la noche, se dejaron crecer hasta una  $A_{600} \sim 0,4$ , momento en el que se indujo la expresión del promotor *Para* con 0,5 % de arabinosa. Transcurridos 90 minutos, en los que se permitió la expresión de los genes, se recolectaron las células por centrifugación y el sedimento se resuspendió en 500  $\mu$ l del tampón de perfiles ribosomales (**Materiales y Métodos**). Las células se lisaron por adición de 15  $\mu$ l de lisozima (10 mg/ml) y por pasos consecutivos de congelación y descongelación con nitrógeno líquido (similar a **Métodos 2.18**).

Para evaluar la emisión de fluorescencia de las proteínas a analizar, se midió la emisión de fluorescencia excitando a 513 nm y realizando un barrido de longitudes de onda de emisión de 520 a 600 nm. Se evaluaron volúmenes crecientes de los extractos obtenidos para cada estirpe. La **figura 36** muestra los resultados obtenidos para los extractos celulares de la cepa MC1061 con los plásmidos pY104 (*eyfp*) y pELI10 (*eyfp-kid*). El extracto de la cepa MC1061 con el vector plasmídico no emitió fluorescencia, tal y como se esperaba (datos no mostrados).

En la **figura 36A** se muestra como los valores de emisión de fluorescencia aumentan según se va añadiendo cantidades crecientes del extracto de MC1061 con el vector pY104 (*eyfp*), de la misma manera que ocurre en el extracto MC1061 con el vector pELI12 (*eyfp-kid*) (**Figura 36B**). Con estos, datos podemos concluir que la proteína de fusión, EYFP-Kid, mantiene la capacidad de emitir fluorescencia de forma similar a como lo hace la proteína silvestre EYFP.

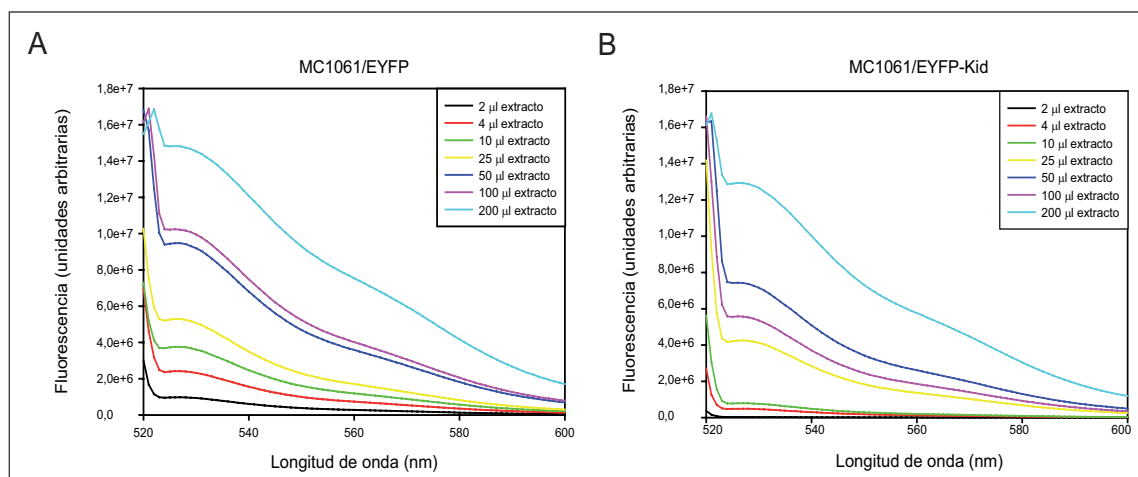


Figura 36.- Espectros de emisión de fluorescencia de los extractos celulares de MC1061, conteniendo los plásmidos pFUS2, pY104 (*eyfp*) y pELI10 (*eyfp-kid*). Las muestras se excitaron a 513 nm, máximo de excitación de la EYFP, y se midió su emisión de fluorescencia en el rango de 520 a 600 nm. A) Espectro de emisión de fluorescencia obtenido cuando se añadieron volúmenes crecientes del extracto de MC1061 conteniendo el plásmido pY104, B) Espectro de emisión de fluorescencia de los extractos conteniendo el plásmido pELI10 (*eyfp-kid*).

- Caracterización de la actividad tóxica de la proteína EYFP-Kid.

Para evaluar si Kid mantenía su actividad citotóxica en la proteína de fusión, se probó su capacidad de inhibir el crecimiento celular. Se comparó la toxicidad de la cepa MC1061 con el vector plasmídico pFUS2, pY104 (*eyfp*), pELI10 (*eyfp-kid*). Como control positivo se utilizó el mismo recombinante llevando el gen *kid*, pFUS-Kid (*kid*). Los ensayos de toxicidad fueron similares a los descritos anteriormente (**Métodos 2.15**). Cultivos crecidos durante toda la noche, se diluyeron 100 veces y se dejaron crecer hasta  $A_{600} \sim 0,35$ . Posteriormente, se sembraron diluciones seriadas de los mismos en placas con kanamicina (50 µg/µl) y glucosa 0,2 %, para reprimir la expresión del promotor (*Para*), o con arabinosa 0,5 % para inducir la. La **figura 37** muestra los datos de toxicidad obtenidos. Se observa que la cepa que lleva la fusión traduccional, EYFP-Kid, fue capaz de inhibir el crecimiento de la misma manera que la cepa que sólo llevaba la proteína Kid. Las cepas con el vector, pFUS2, o con la proteína EYFP, no mostraron indicios de toxicidad asociada a su expresión tal y como se esperaba.



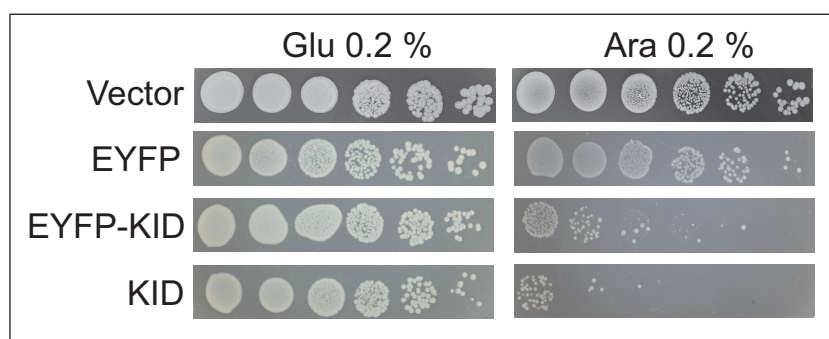


Figura 37.- Ensayos de toxicidad de la cepa MC1061 conteniendo los plásmidos pFUS2, pY104 (*eyfp*), pELI10 (*eyfp-kid*) y pFUSKid (*kid*). Se creció la cepa MC1061 llevando los plásmidos pFUS2, pY104 (*eyfp*), pELI10 (*eyfp-kid*) y pFUSKid (*kid*) hasta fase exponencial ( $A_{600}=0,35$ ) en medio LBT. Se realizaron diluciones seriadas de los diferentes cultivos y se sembraron en placas de LBT-agar con kanamicina (diluciones seriadas 1/10 de izquierda a derecha). La represión del promotor se llevó a cabo por la presencia de glucosa al 0,2 % en el medio. La inducción de la expresión del promotor se realizó con arabinosa al 0,5 %.

*De este modo, la fusión traduccional EYFP-Kid resulta apropiada para valorar in vivo la interacción de la toxina con el ribosoma, al mantener EYFP su carácter de fluoróforo, y Kid su actividad tóxica.*

### 3.2.1.2 Estudio de las interacciones con el ribosoma

Para comprobar las posibles interacciones de la toxina Kid con el ribosoma, se llevó a cabo el análisis de perfiles ribosomales en las células en las que se indujo la proteína de fusión; tras su fraccionamiento, la posible presencia de la toxina Kid-EYFP en dichas fracciones ribosomales se analizó determinando su emisión de fluorescencia. Para llevar a cabo el análisis de los perfiles ribosomales se utilizó un procedimiento similar al descrito por N. A. Woychik y colaboradores (Liu y col., 2008, Prysak y col., 2009), aunque con ligeras modificaciones (**Métodos 2.18**). Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Prof. Juan Pedro García Ballesta. En primer lugar se obtuvieron extractos celulares de la cepa MC1061, conteniendo los plásmidos pY104 (*eyfp*) y pELI10 (*eyfp-kid*), y de KR19 con el plásmido pELI10. Debido a que esta cepa es hipersensible a la toxina, se pensó que las posibles interacciones con el ribosoma podrían ser mayores. Se añadieron 20 unidades de  $A_{260}$  de los extractos obtenidos tras la inducción de la expresión de la proteína, a 12 ml de gradiente de sacarosa 5-40 %. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 39000 rpm, en un rotor SW 40, durante 135 minutos. Se realizó el fraccionamiento de los gradientes, recolectándose 20 fracciones de 500  $\mu$ l. Posteriormente, dichas fracciones se analizaron, mediante la detección de emisión de fluorescencia, para revelar la presencia de las proteínas EYFP y EYFP-Kid, en alguna de ellas. La **figura 38** muestra los valores de emisión de fluorescencia de las 20 fracciones analizadas, de cada uno de los tres extractos ensayados, en el máximo de 527 nm. Se puede observar que los patrones de emisión encontrados son muy similares en los tres casos. No se detectó un aumento de la fluorescencia claro en las fracciones

ribosomales de los extractos que tenían Kid fusionada traduccionalmente (**Figura 38B y 38C**). Al comparar la fluorescencia de las fracciones con los datos de absorbancia a 254 nm de los perfiles ribosomales se ve que la fluorescencia obtenida no corresponde con ninguna fracción del ribosoma (ni 30S, ni 50S ni 70S), sino con la parte superior del gradiente de sacarosa en la que permanecen las proteínas que no entran en el mismo (**Figura 38, comparar A-D, B-E y C-F**).

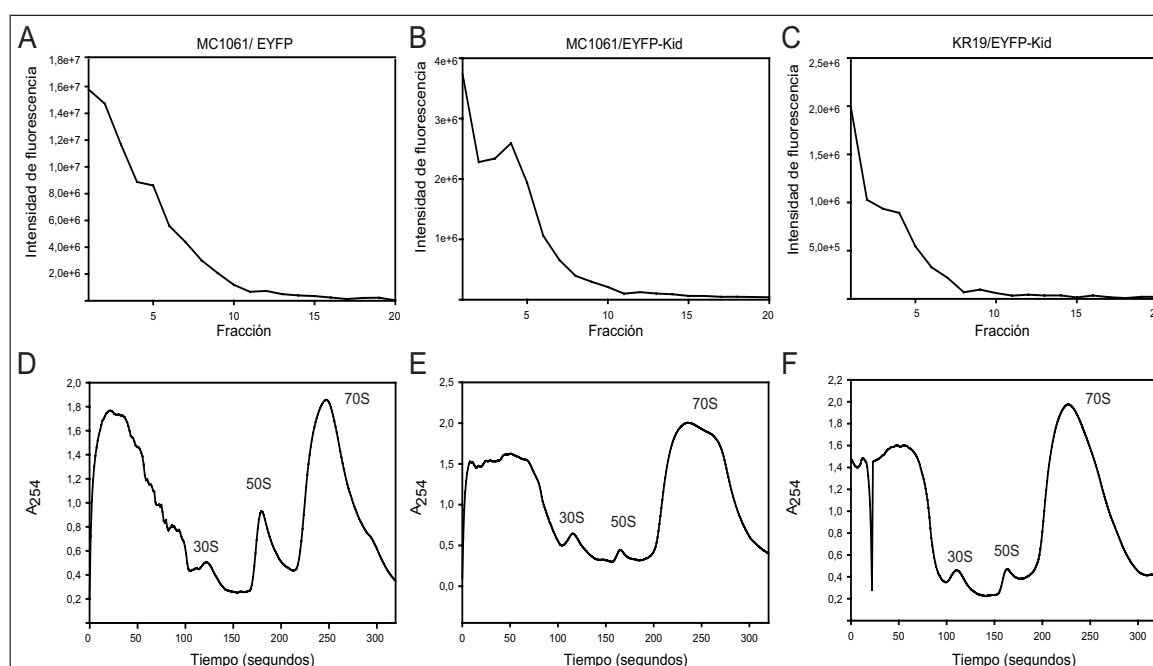


Figura 38.- Perfiles ribosomales y valores de emisión de fluorescencia de las fracciones de los perfiles ribosomales. Los perfiles ribosomales se obtuvieron al procesar los gradientes de sacarosa monitorizando su absorbancia a 254 nm. A) Valores de emisión de fluorescencia obtenidos para la cepa MC1061 con el plásmido pY104 (*eyfp*), B) Valores de emisión de fluorescencia obtenidos para la cepa MC1061 con el plásmido pELI10 (*eyfp-Kid*), C) Valores de emisión de fluorescencia obtenidos para la cepa KR19 con el vector pELI10. Las 20 fracciones analizadas se excitaron a 513 nm y se detectó la emisión de fluorescencia a 527 nm. D) Perfil ribosomal de la cepa MC1061 con el plásmido pY104, E) Perfil ribosomal de la cepa MC1061 con el plásmido pELI10 (*eyfp-Kid*), F) Perfil ribosomal de la cepa KR19 con el vector pELI10. Las fracciones que se muestran en la gráfica corresponden con el tiempo en el cual se obtuvo la medida de A<sub>254</sub> del perfil ribosomal.

*La proteína Kid-EYFP no permite detectar interacciones Kid:ribosoma in vivo en extractos celulares procesados en gradientes de sacarosa, lo que parece indicar que no existen dichas interacciones. Sin embargo, no puede descartarse la existencia de un tipo de interacción débil (ver discusión).*



### 3.2.2 OBTENCIÓN DE UNA PROTEÍNA KID FUNCIONAL MARCADA CON EL FLUORÓFORO ALEXA 488 PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA KID CON EL RIBOSOMA

#### 3.2.2.1 Obtención de proteína KidC74SC111 marcada con el fluoróforo Alexa 488 C<sub>2</sub> Maleimida

Para hacer nuevos estudios de la posible interacción de la proteína Kid con el ribosoma, se procedió, en primer lugar, al marcaje de Kid con el fluoróforo Alexa 488. El procedimiento se basó en la unión del fluoróforo al aminoácido cisteína mediante una reacción con maleimida (**ver Métodos 2.5.4**). La proteína Kid silvestre posee una cisteína intrínseca en la posición 74. Datos previos mostraron que la mutación C74Y afectó tanto al carácter regulador de la proteína como, en menor medida, a su actividad citotóxica (Lemonnier y col., 2004). Por lo tanto, se eligió mutagenizar el residuo C74 para sustituirlo por serina. Con esta sustitución, la estructura de la cadena lateral del aminoácido se mantiene, ya que se sustituye la presencia de azufre, en la cadena lateral del residuo, por un residuo OH. Después de producir el cambio C74S en el plásmido pRG-hisKisKid, se procedió a introducir un residuo cisteína en el extremo C-terminal de la proteína (C111). Se escogió el extremo C-terminal ya que datos previos de nuestro laboratorio indicaron que la elongación de este extremo con una cola de 6 histidinas mantenía la actividad de la proteína (datos no mostrados). Por tanto, la construcción con la que se trabajó fue el vector pRG-hisKisKidC74SC111STOP. Tras la purificación de ambas proteínas, KidC74S y KidC74SC111, se procedió al marcaje de ésta última con el fluoróforo Alexa 488, tal y como se describió anteriormente (**Métodos 2.5.4**).

- Caracterización bioquímica de la proteína KidC74SC111-Alexa

Para poder realizar estudios bioquímicos con la proteína Kid mutante marcada con el fluoróforo, se consideró necesario que dicha proteína mantuviera la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas, y que su estructura fuera similar a la de la proteína silvestre.

La actividad inhibidora de la síntesis de proteínas se ensayó en extractos celulares de *E. coli*, monitorizando la síntesis de la proteína Luciferasa, en presencia de las distintas proteínas Kid, a una concentración de 0,3  $\mu$ M (**Métodos 2.6.2**). En la **figura 39** se observa que la proteína mutante KidC74S (C74S) no mostró efectos sobre la actividad inhibidora de la síntesis de proteínas, ya que la síntesis de la Luciferasa fue inhibida de forma similar a como lo hace la proteína silvestre (S). En cambio, la introducción de la cisteína C111 en Kid (C74SC111), produjo pérdida de su actividad inhibidora en estos ensayos. De igual manera, se muestra que la proteína KidC74SC111-Alexa ha perdido totalmente su actividad inhibidora de la síntesis de proteínas (Alexa). El control negativo (C-) indica que la adición de cloranfenicol inhibe la síntesis de proteína (1  $\mu$ g/ $\mu$ l). El control positivo (C+) indica que la adición del tampón de dilución de proteínas no interfiere con el ensayo de síntesis de proteínas.

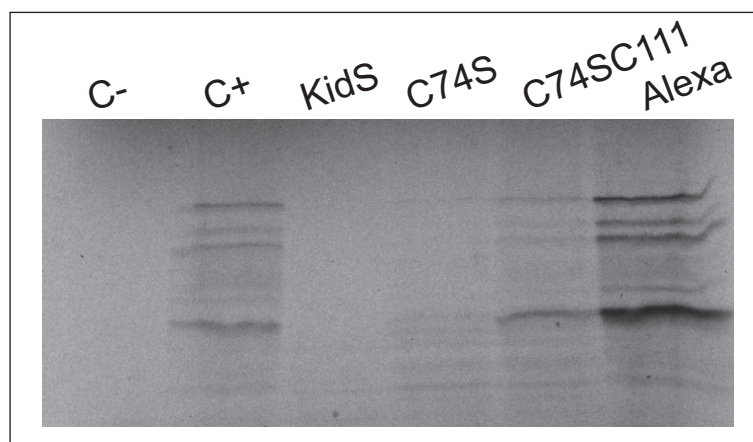


Figura 39.- Inhibición de la síntesis de proteínas mediada por las diferentes proteínas Kid. C-: control negativo con Cm (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), C+: control positivo con tampón de dilución de proteínas, S: Kid silvestre (300 nM), C74S: KidC74S (300 nM), C74SC111: KidC74SC111 (300 nM), y Alexa: KidC74SC111-Alexa (300 nM). Las muestras se fraccionaron por SDS-PAGE (12,5 %) y se identificaron por autorradiografía, tal y como se indica en **Métodos 2.6.3**.

Para analizar si la pérdida de funcionalidad observada en la proteína KidC74SC111-Alexa se debía a cambios estructurales importantes en la proteína, se caracterizó su estructura por dicroísmo circular. Se utilizaron la proteína silvestre y la proteína KidC74SC111-Alexa, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , en tampón fosfato 100 mM pH 7,0. Se observó que los mínimos del espectro de dicroísmo circular obtenidos estaban alterados respecto a los valores obtenidos con la proteína silvestre (datos no mostrados). Los datos de desnaturalización térmica mostraron que la proteína KidC74SC111-Alexa era más sensible a la temperatura, ya que su  $T_m$  difería en 15  $^{\circ}\text{C}$  con respecto a la de la proteína silvestre (**Figura 40**).

A la vista de estos resultados, se procedió a explorar si la marca de la toxina Kid silvestre con el fluoróforo en la cisteína 74, daba lugar a una proteína funcional.

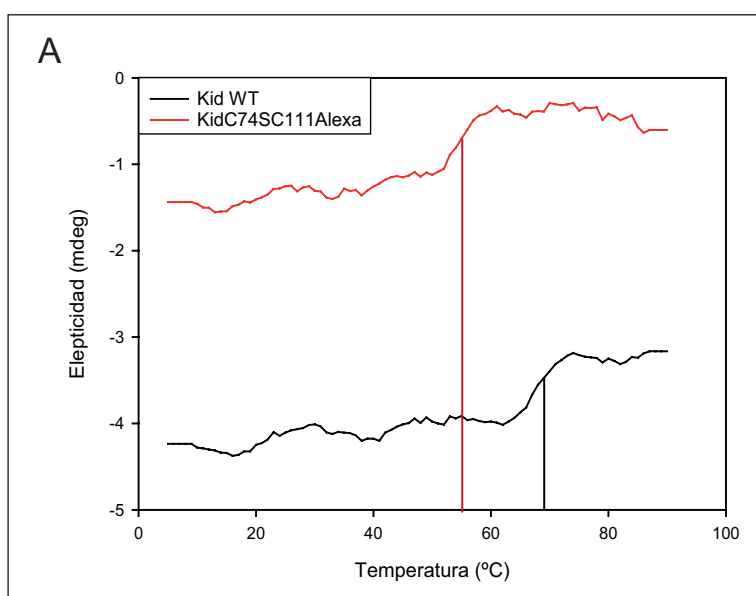


Figura 40.- Espectros de dicroísmo circular de las proteínas Kid silvestre y KidC74SC111-Alexa. Las proteínas se utilizaron a 10  $\mu\text{M}$ , en tampón fosfato pH 7,0. Se muestra el espectro de desnaturalización térmica de las proteínas Kid silvestre y KidC74SC111-Alexa, monitorizando a la longitud de onda de 220 nm.

### 3.2.2.2 Obtención de la proteína Kid silvestre marcada con el fluoróforo Alexa 488 C<sub>s</sub> maleimida

Debido a los problemas descritos anteriormente, tanto con la proteína KidC74SC111, como con la versión marcada con el fluoróforo Alexa 488, se procedió al marcaje de la proteína Kid silvestre, según lo descrito anteriormente (**ver Métodos 2.5.4**). La proteína silvestre marcada en el residuo cisteína 74, se denominó Kid-Alexa.

De igual forma que con la proteína anterior, KidC74SC111-Alexa, se ensayó la actividad inhibidora de síntesis de proteínas de Kid-Alexa, así como su capacidad de ser neutralizada por la antitoxina Kis. La **figura 41** muestra los resultados de inhibición de proteínas en extractos S30 de *E. coli*. Puede observarse como la proteína marcada con Alexa 488 seguía manteniendo la capacidad de inhibir síntesis de proteínas (carriles Kid-Alexa 0,5-1,5  $\mu$ M) y, además, que la antitoxina Kis (Kis 3  $\mu$ M) fue capaz de neutralizar dicha actividad a la máxima concentración de la toxina (Kid 1,5  $\mu$ M) de forma similar a como lo hace con la proteína silvestre (KidS). Este resultado indica que la proteína Kid-Alexa mantiene su potencial inhibidor de la síntesis de proteínas y de ser neutralizada por Kis.

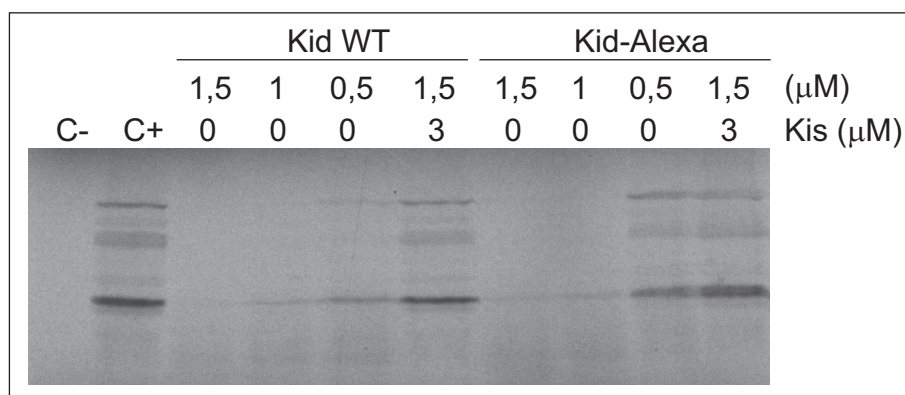


Figura 41.- Inhibición de síntesis de proteínas por Kid silvestre y Kid-Alexa. Síntesis de la proteína Luciferasa en presencia de la toxina Kid silvestre (KidS) o de la proteína Kid-Alexa. En el control negativo (C-) se añadió cloranfenicol (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) y en el control positivo (C+) se añadió el tampón de síntesis de proteínas. Las proteínas Kid y Kid-Alexa, se añadieron a 3 concentraciones diferentes (0,5, 1 y 1,5  $\mu$ M). Se muestra la neutralización de Kid (1,5  $\mu$ M) por la antitoxina Kis (3  $\mu$ M).

Asimismo, se analizó la estructura de esta proteína mediante dicroísmo circular. La **figura 42** muestra el perfil de desnaturalización térmica de la proteína que indica que su T<sub>m</sub> (66.4 °C) es bastante similar a la T<sub>m</sub> de la toxina Kid silvestre (71 °C).

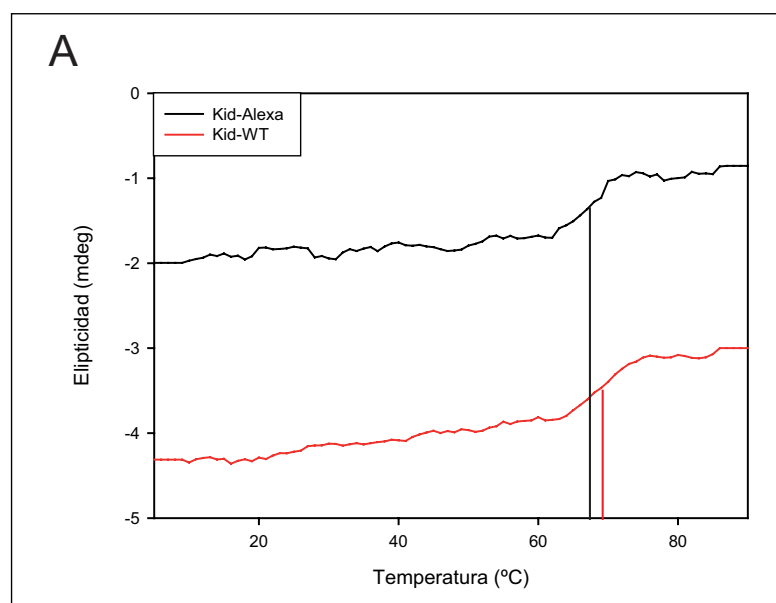


Figura 42.- Espectros de dicroísmo circular de las proteínas Kid silvestre y Kid-Alexa. Espectro de desnaturalización térmica de las proteínas Kid silvestre y Kid-Alexa monitorizando a la longitud de onda de 220 nm.

*Estos datos sugieren que Kid-Alexa marcada en C74 es una potencial herramienta para futuros estudios de la interacción toxina-ribosoma.*



## VII. DISCUSIÓN





## 1 VALIDACIÓN DEL MODELO DE UNIÓN Y CORTE DEL ARN POR LA TOXINA KID

Kid es una ARNasa ciclante que corta ARN preferente en cadena sencilla entre U y A en secuencias que contienen el triplete 5'-UA(C/A)-3' (Munoz-Gomez y col., 2005). El corte ocurre por un mecanismo similar al de las ARNasas A y T1 (Kamphuis y col., 2006). Basándose en el modelo de interacción de Kid con el ARN sustrato 5'-AdUACA-3' descrito por Kamphuis y colaboradores (Kamphuis y col., 2006), se ha caracterizado el papel de determinados residuos propuestos en el modelo que, o bien forman parte del centro catalítico de la proteína, o bien pueden estar implicados en la unión general de ésta a su ARN sustrato o en la unión más específica a las bases de la secuencia de corte. Dicho modelo propone que el centro activo de la proteína está formado por los residuos D75, R73 y H17, que actuarían como base y ácido catalítico y residuo estabilizador, respectivamente. El modelo también postula que los residuos T46, S47, A55, F57, T69, V71 y R73 podrían interaccionar con las bases del ARN estableciendo puentes de hidrógeno o contactos hidrofóbicos que contribuirían a la especificidad de unión al ARN. En la elaboración de este modelo se emplearon sustratos de ARN de pequeño tamaño que permiten por una parte un modelado eficiente de la interacción ARN-proteína, y por otra parte la utilización de la técnica de espectrometría de masas. Dicha elección se basó en la capacidad de esta técnica para identificar complejos proteína-ácidos nucleicos, y para monitorizar reacciones de corte de ácidos nucleicos (van den Heuvel y col., 2005). Para la evaluación de la unión al ARN, se empleó un sustrato mimético no escindible por la proteína, 5'-AdUACA-3', mientras que para la evaluación de la rotura del ARN se usó el sustrato 5'-AUACA-3'. Los estudios llevados a cabo con este último sustrato, confirmaron que el fosfato objeto de corte es el que establece el enlace fosfodiéster entre las bases U y A.

Para la evaluación del modelo de actividad ARNasa de la proteína Kid, se analizaron los efectos de mutaciones sencillas y dobles en algunos de los residuos que, según el modelo, estaban implicados en la unión al ARN (T46, A55, T69 y R85). Asimismo, en los mismos ensayos se analizó el efecto de mutaciones en todos los residuos que forman parte del centro activo propuesto (H17, R73 y D75). Algunos de estos cambios fueron obtenidos por mutaciones espontáneas, pero debido a que no se lograron mutaciones en todos los residuos objetos de estudio, se obtuvieron dichas mutaciones mediante mutagénesis dirigida. Las proteínas mutantes elegidas para su caracterización fueron KidT46G, KidA55G, KidT69G, KidT46G/T69G, KidA55G/T69G, KidD75E, KidD75N, KidR73H, KidH17P y KidE5G (**Introducción Figura 4**). Puesto que la proteína KidE5G no resultó ser estable *in vivo*, se descartó su estudio en la presente investigación. Cabe destacar que la mayoría de las mutaciones espontáneas halladas, tanto cambios puntuales como inserciones y deleciones, se localizaron en una región adyacente al residuo E5, en lo que podría denominarse un punto caliente, *hotspot*, para acumular mutaciones que inactivan o inestabilizan a la proteína (**Resultados Tabla 5 y Figura 10**).

Tras evaluar la estabilidad, la estructura secundaria y la capacidad de las proteínas Kid mutantes para interaccionar con la antitoxina formando complejos T-A capaces de mantener su función reguladora, se pudo concluir que las mutaciones seleccionadas no afectaban de forma global a otras actividades de la proteína y que, por lo tanto, eran apropiadas para evaluar su efecto específico sobre la unión o rotura del ARN.

En el análisis de los efectos de las mutaciones en la unión y catálisis del ARN mediante espectrometría de masas, se han utilizado tres sustratos de pequeño tamaño. Para analizar la progresión de las reacciones de corte se utilizaron los sustratos 5'-AUACA-3', usado previamente para determinar la actividad ARNasa de Kid, y el sustrato 5'-UUACA-3', por el que Kid muestra mayor preferencia tanto *in vivo* como *in vitro* (Pimentel y col., 2005, Kamphuis y col., 2006). Por último, para comparar la unión las proteínas analizadas al ARN, se empleó el sustrato no procesable 5-AdUACA-3, utilizado previamente en el modelado del complejo de unión de Kid al ARN (Kamphuis y col., 2006)

### *Análisis de mutaciones en residuos implicados específicamente en unión al sustrato*

Entre los residuos analizados implicados en la especificidad de unión (**ver introducción**), se seleccionaron los residuos A55 y T69 debido a que establecen puentes de hidrógeno con las bases que forman el núcleo de la secuencia de ARN procesada por Kid (**Figura 4, líneas punteadas**). Ambos residuos están localizados en una región flexible de la toxina (**Figura 4**). Se llevó a cabo la sustitución de ambos residuos por glicina con el fin de interferir en la formación de los puentes de hidrógeno con las bases de la secuencia consenso del ARN, sin modificar sustancialmente la región flexible en la que se localizan. Los resultados indican que las mutaciones de dichos residuos inducen efectos claros en la unión de las proteínas al ARN, sin que se inactive su capacidad de corte ni su especificidad. Por lo tanto, estos datos parecen indicar la participación de estos residuos en la unión al ARN. Sin embargo, mutaciones sencillas o dobles en los residuos estudiados no parecen ser suficientes para afectar en la especificidad del corte, lo que sugiere la participación de múltiples residuos en dicha especificidad. En este caso, la especificidad de corte debe de estar determinada por las interacciones globales de varios residuos, a través de contactos hidrofóbicos o de puentes de hidrógeno establecidos con las bases del ARN. La disminución de la eficiencia de corte observada en las proteínas mutantes, probablemente debe ser consecuencia indirecta de la menor unión al sustrato. Además, estas proteínas mutantes conservan la capacidad de inhibir síntesis de proteínas y, por lo tanto, afectan a la viabilidad y al crecimiento celular. La menor inhibición del proceso de síntesis de proteína hallada en KidA55G con respecto a KidT69G, no se ve reflejada en los ensayos de toxicidad. Es más, se observa una inhibición del crecimiento celular más acusada que la observada en presencia de la proteína silvestre. Este último hecho puede deberse a que en el ensayo empleado en la evaluación de toxicidad, la antitoxina generada a 42 °C está truncada en su extremo C-terminal. Por lo tanto, pueden existir complejidades desconocidas

debidas a la interacción de las proteínas Kid mutantes con la antitoxina trunca, que expliquen la mayor inhibición del crecimiento observada. Por otra parte, la proteína doble mutante KidA55G/T69G muestra un menor efecto, en comparación con los mutantes sencillos, tanto en la inhibición de la síntesis de proteínas como en la del crecimiento.

La mutación KidT46G origina unos efectos en la unión al ARN similares a los de las proteínas KidA55G y KidT69G, aunque, a diferencia de ellas, muestra un efecto drástico en la eficiencia de corte del ARN. Los resultados de rotura con sustratos más largos (CopT) muestran una actividad ARNasa residual en la que se mantiene la especificidad de corte (**Resultados Figura 20**). Una posible hipótesis que explicaría dichos resultados sería que esta mutación causara la extensión del lazo S3-S4, formado por la región comprendida entre los residuos S47 y F57, que conforma una región dinámica de la proteína (M. Kamphuis, datos no publicados). La extensión del lazo podría permitir que residuos adyacentes al mismo interfirieran con residuos del centro catalítico, impidiendo su correcto funcionamiento. Otra hipótesis posible sería que la mutación T46G pudiese interferir en la unión correcta del sustrato, impidiendo así un corte eficiente. El residuo T46 está altamente conservado en el alineamiento de secuencias de proteínas homólogas, lo cual sugiere una posible implicación en el reconocimiento específico del sustrato (Hargreaves y col., 2002b). El doble mutante KidT46G/T69G posee el mismo fenotipo que el mutante KidT46G, lo que indica que la mutación T46G es dominante frente a la mutación T69G.

El mutante KidR85W afecta de un modo más drástico en la unión al ARN con respecto al resto de mutantes. El residuo R85 establece un puente salino con el residuo E18, estabilizando la superficie de unión de Kid al ARN. La mutación R85W impide la formación de dicho puente salino, permitiendo una distorsión local en la estructura del dímero. Además, el mutante carece de la carga positiva del residuo R85, por lo que se expondrá así a la carga negativa del residuo E18, pudiendo afectar a la interacción con el ARN (Santos-Sierra y col., 2003). Estos cambios explicarían la actividad ARNasa residual de esta proteína, pues su centro catalítico no se vería muy afectado. Además de estos efectos, se podría distorsionar el lazo S1-S2, formado por la región que comprende los residuos del L11 al G21 (M. Kamphuis, datos no publicados) y que incluye el residuo H17 que forma parte del centro catalítico de la proteína. La especificidad de corte de este mutante resulta ser igual a la de la proteína silvestre, tal y como se demuestra en los ensayos de actividad ARNasa residual en sustratos de ARN largos. Dicha actividad residual y específica, indica que la mutación no impide totalmente la actividad ARNasa de la proteína. Además, esta mutación no produce efectos sobre el crecimiento celular, lo que concuerda con su incapacidad para inhibir la síntesis de proteínas (**Resultados Figura 25 y 26**). Así mismo, la actividad ARNasa residual que se encuentra en la solución no se detecta en extractos celulares (Munoz-Gomez y col., 2005), lo que explicaría la ausencia de toxicidad *in vivo*. Esta diferencia sugiere la posible modulación de la actividad de la proteína *in vivo* por uno o más factores celulares no identificados hasta la fecha.

### *Análisis de las mutaciones en residuos del sitio catalítico*

Las mutaciones R73H, D75N, D75E y H17P afectan claramente a la eficiencia de corte del ARN, pero no a la eficiencia de unión al sustrato. Las posiciones y funciones de los residuos R73, D75 y H17 son equivalentes a los residuos del sitio activo de ARNsas A y T1 (Kamphuis y col., 2006). Las mutaciones introducidas en estos residuos deben impedir el efecto de dichos residuos en la rotura del ARN, pero no en la unión al sustrato. Se han obtenido los siguientes resultados para cada una de las mutaciones introducidas:

- i) Mutación R73H: los aminoácidos arginina e histidina son ácidos monocarboxílicos con bases aminas, donde el tamaño y forma de sus respectivas cadenas laterales son diferentes. Estas diferencias impiden que la histidina sea capaz de sustituir a la arginina como ácido catalítico. R73, además de actuar como ácido catalítico puede reducir el  $pK_a$  del grupo 2'-OH de la base del ARN al donar un hidrógeno cargado al 2'-O. Dicha acción puede ser realizada por una arginina pero no por una histidina. Otra función asignada a este residuo es la de participar en la especificidad de unión a la secuencia consenso, mediante contactos hidrofóbicos y puentes de hidrógeno con las bases del ARN. Sin embargo, los ensayos de unión proteína-ARN no detectaron efectos en la unión al ARN lo cual sugiere que R73 puede no estar participando en la especificidad de unión tal y como el modelo proponía, o que la histidina puede llegar a suplir esa acción.
- ii) Mutación D75N: el aspártico y la asparragina son el ácido dicarboxílico y su correspondiente amida. La estereoquímica de ambos residuos es similar pero la asparragina no posee el carácter ácido necesario para que actúe como base catalítica. En consecuencia, esta mutación impide que se lleve a cabo correctamente la reacción de corte.
- iii) Mutación D75E: el aspártico y el glutámico son ácidos dicarboxílicos; la diferencia entre estos dos aminoácidos estriba en que el glutámico posee un carbono adicional en la cadena lateral. El efecto tan claro obtenido en la actividad ARNasa de este mutante, indica que además del carácter ácido, la longitud de la cadena lateral es imprescindible para una catálisis eficiente. La actividad ARNasa residual de este mutante en sustratos de ARN más largos, prueba que el residuo ácido puede desempeñar su papel como base catalítica en el centro activo de la proteína, pero que lo hace de un modo menos eficiente en comparación con el residuo D75. Ambas sustituciones apoyan el papel propuesto de D75 como catalizador básico.
- iv) Mutación H17P: en esta mutación el anillo pirrólico de la histidina es sustituido por el anillo heterocíclico de la prolina, anillo que carece de residuos cargados. Por lo tanto, se elimina la amina responsable de establecer el puente de hidrógeno con el oxígeno del fosfato de la ribosa del ARN que se requiere, según propone el modelo, para estabilizar el intermediario de la reacción de corte (Kamphuis y col., 2006). El hecho

de que el mutante inactive la actividad ARNasa de Kid es consistente con la propuesta del modelo.

Los resultados obtenidos corroboran el papel asignado a los diferentes residuos; en particular, la inactivación de Kid por las dos sustituciones en D75 (D75N, D75E) valida el papel de este residuo como base catalítica.

#### *Sustratos y especificidad de corte*

El trabajo realizado por Pimentel y colaboradores (Pimentel y col., 2005) indica que Kid corta con preferencia el ARNm de *copB-repA* del plásmido R1 en la secuencia 5'-UUACU-3'. Este corte juega un papel importante en la regulación de los niveles de las proteínas CopB/RepA y en la eficiencia de la replicación del plásmido. El corte de esta secuencia en otros ARNm celulares puede a su vez tener un papel importante en la inhibición de la síntesis de proteínas y en el crecimiento celular mediado por esta toxina. Los datos de Zhang y colaboradores indican que la secuencia 5'-UUACU-3' no es la única diana *in vivo* de Kid/PemK (Zhang y col., 2004). Los cortes producidos por PemK *in vivo* reportados por estos autores se producían no solo en la diana 5'-UUACU-3', sino también en las secuencias 5'-CUACU-3' y 5'-CUACG-3'. Como se puede observar, todas las secuencias diana poseen el triplete consenso 5'-UAC-3' que también está presente en todos los sustratos que hemos utilizado en nuestro trabajo experimental. Nuestros datos confirman que los residuos que flanquean este núcleo central influyen la eficiencia de corte del ARN por la toxina. No puede descartarse en cualquier caso que el corte de esta toxina en las secuencias menos favorables no sea relevante. Una complejidad adicional la introduce la capacidad de la toxina de cortar el ARN no sólo a 5' sino también cortar a 3' de la adenosina (Zhang y col., 2004). El mecanismo de esta reacción queda por esclarecer, pero en principio el 2'-OH del azúcar de la adenosina puede actuar, con la ayuda de un residuo catalítico que actúe como base, rompiendo el enlace fosfato que une la adenosina y la base adyacente en 3'.

Debe tenerse en cuenta que pueden existir factores del proceso de la traducción de proteínas o el propio proceso en sí, que pueden estar influyendo en la actividad de la proteína o en su accesibilidad a las secuencias de cortes. Este tipo de modulación se ha hallado en toxinas de otros sistemas T-A. Por ejemplo, las toxinas YafQ y YoeB muestran *in vitro* poca preferencia de corte: YafQ produce cortes cerca de regiones que contienen la secuencia 5'-GG-3' (Prysak y col., 2009), mientras que YoeB corta en regiones ricas en purinas (Kamada y Hanaoka, 2005). Sin embargo, en contexto ribosomal se aprecia una especificidad de secuencia mayor, por ejemplo YafQ corta en codones de lisina (AAA) que estén en el marco de lectura, mientras que YoeB lo hace dentro de regiones que se están traduciendo, con una preferencia por codones de terminación similar a la de la toxina RelE (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2008). Por otra parte, el proceso de traducción es capaz de incrementar la accesibilidad a dianas preferentes que por estar enmascaradas en cadena doble, no se cortarían eficientemente. La preferencia



por el corte del ARN en dianas expuestas en cadena sencilla se ha demostrado en el caso de las toxinas Kid y ChpAK (MazF) (Munoz-Gomez y col., 2005, Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2008, Zhu y col., 2008). Además, según se ha comprobado para RelE, puede existir una competición del corte *in vitro* con RF1, peptidil ARNt e incluso con factores de elongación, por lo que algunos componentes del proceso de traducción pueden influir en dicha eficiencia de corte (Pedersen y col., 2003).

Por lo tanto, en el caso de la toxina Kid, que también produce la inhibición de la síntesis de proteínas y que muestra homología con ChpAK (MazF), es posible que el proceso de corte del ARN pueda estar también influenciado por el proceso de traducción en sí o por factores del ribosoma. La disponibilidad de nuevos mutantes en el factor de terminación de traducción RF1, ha abierto una vía a este análisis que se ha explorado en la presente tesis y que es el objeto del siguiente apartado de discusión.

## 2 IMPLICACIÓN DE LA TOXINA KID EN EL PROCESO DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

### *Aislamiento y caracterización de nuevos mutantes en el gen del factor de terminación de traducción RF1*

En el segundo apartado de resultados del presente trabajo, presentamos el aislamiento y la caracterización de nuevas mutaciones en el gen *prfA* no termosensibles y diferentes a otras mutaciones descritas con anterioridad (Ryden y Isaksson, 1984). Dichas mutaciones fueron aisladas utilizando una variante del sistema T-A *parD* (*kis-kid*), en el cual el gen de la antitoxina *kis* contiene una mutación ámbar (UAG) prematura (*kis74*) que da lugar a una antitoxina truncada e incapaz de neutralizar a la toxina Kid. La interferencia con crecimiento celular asociada a la actividad de la toxina permite, mediante una selección directa, aislar mutaciones cromosómicas que permitan a la célula sobrevivir a la acción de la toxina. Todas las mutaciones aisladas afectaban al factor de terminación de la traducción RF1 que reconoce codones de terminación UAG y UAA y que hacen una lectura a través de la mutación ámbar en *kis* (UAG), restaurando así una antitoxina funcional capaz de neutralizar a la toxina y permitir el crecimiento celular. El codón de terminación silvestre de *kis* es UGA, que es reconocido por el factor RF2. En consecuencia, la terminación de la antitoxina Kis no se ve afectada por las mutaciones en *prfA*. Estos datos explican que solo surgieran mutaciones en RF1 y no en el factor RF2, ya que este último factor de terminación no participa en el reconocimiento del codón UAG y sí en el reconocimiento de codones de terminación UGA y UAA. Por lo tanto, mutaciones en este factor que afectaran a la eficiencia de terminación, no habrían permitido generar una antitoxina de tamaño completo capaz de neutralizar a la toxina Kid.

Los tres residuos mutantes aislados en el RF1 se sitúan en las proximidades de una región implicada en el reconocimiento de los codones de terminación (**Figura 43**). Esta región

incluye el motivo de decodificación formado por tres aminoácidos que en el caso de RF1 son PxT, en las posiciones 188-190, mientras que para RF2 son SPF, en las posiciones 205-207 (Ito y col., 2000). Dicho motivo tripeptídico juega un papel importante en el reconocimiento del primero y segundo nucleótido del codón de terminación (Laurberg y col., 2008). Esta región incluye, además, el extremo de la hélice  $\alpha 5$  (**Figura 43**), que tanto en RF1 como en RF2 ayuda a posicionar las purinas que están presentes, en todos los codones de terminación, en la primera posición (Petry y col., 2005, Laurberg y col., 2008).

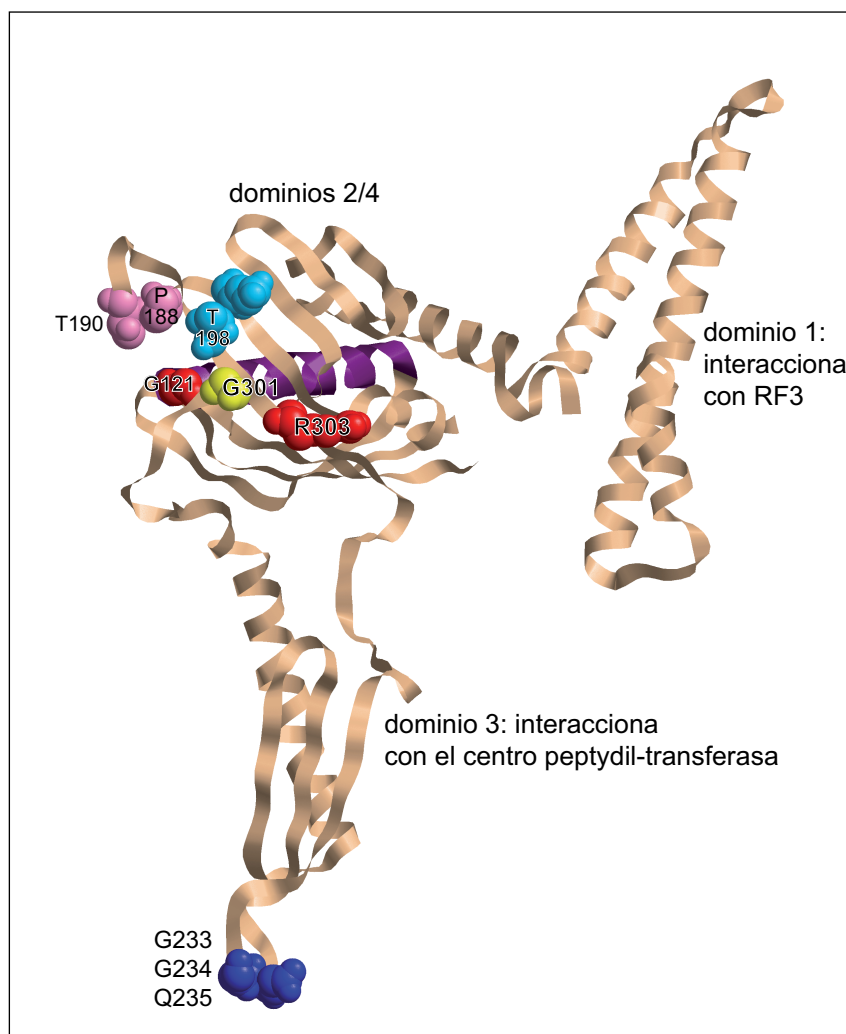


Figura 43.- Posiciones de las mutaciones en el factor RF1 en relación a los dominios y motivos de secuencia importantes en su funcionalidad. Las posiciones de los residuos mutados G121, G301 y G303 se muestran en bolas de color rojo (G121 y G303) o en amarillo (G301) en el modelo de estructura abierta del RF1 de *Thermotoga maritima* representado en cintas (Vestergaard y col., 2005). La estructura de la  $\alpha$ -hélice, con el residuo G121 en un extremo, se muestra en violeta. El motivo PxT implicado en el reconocimiento de codones de terminación (Ito y col., 2000) se muestra en bolas rosas, y los residuos T198 y Q185 que interaccionan con la base tercera del codón de terminación en azul claro (Laurberg y col., 2008). El motivo GGQ que contacta con el centro de transferencia peptídico (PTC) y que provoca la hidrólisis del peptidil-ARNt, se muestra en azul.



La mutación G121, cepa KR17, se sitúa en el extremo de la hélice  $\alpha$ -5 y está ubicada a aproximadamente 6 Å de los dos primeros nucleótidos U4 y A5 del codón de terminación del ARNm (**Figura 44**). La mutación R303, cepa KR4, está cerca de los nucleótidos A1492 y A1493 del ARNr 16S, implicados en el reconocimiento por parte del ARNt de los codones con sentido que se sitúan en el sitio A del ribosoma (Ogle y col., 2001, Ogle y Ramakrishnan, 2005), además de participar en la terminación de la traducción (Laurberg y col., 2008), junto con otros nucleótidos adyacentes. Tanto el residuo R303 como G301 se sitúan próximos a la proteína ribosomal S12 que interviene en el reconocimiento específico de codones de terminación (**Figura 44**), mutaciones en dicha proteína afectan a la precisión de dicho reconocimiento (Sharma y col., 2007). Así pues, todas las mutaciones se sitúan cerca del lugar de reconocimiento de los codones de terminación y, por lo tanto, los efectos hallados en la eficiencia de terminación mediada por estas proteínas RF1 coinciden con datos estructurales y funcionales de la proteína determinados hasta la fecha. Sería interesante estudiar los efectos de estas mutaciones en la fidelidad de reconocimiento del codón de terminación.

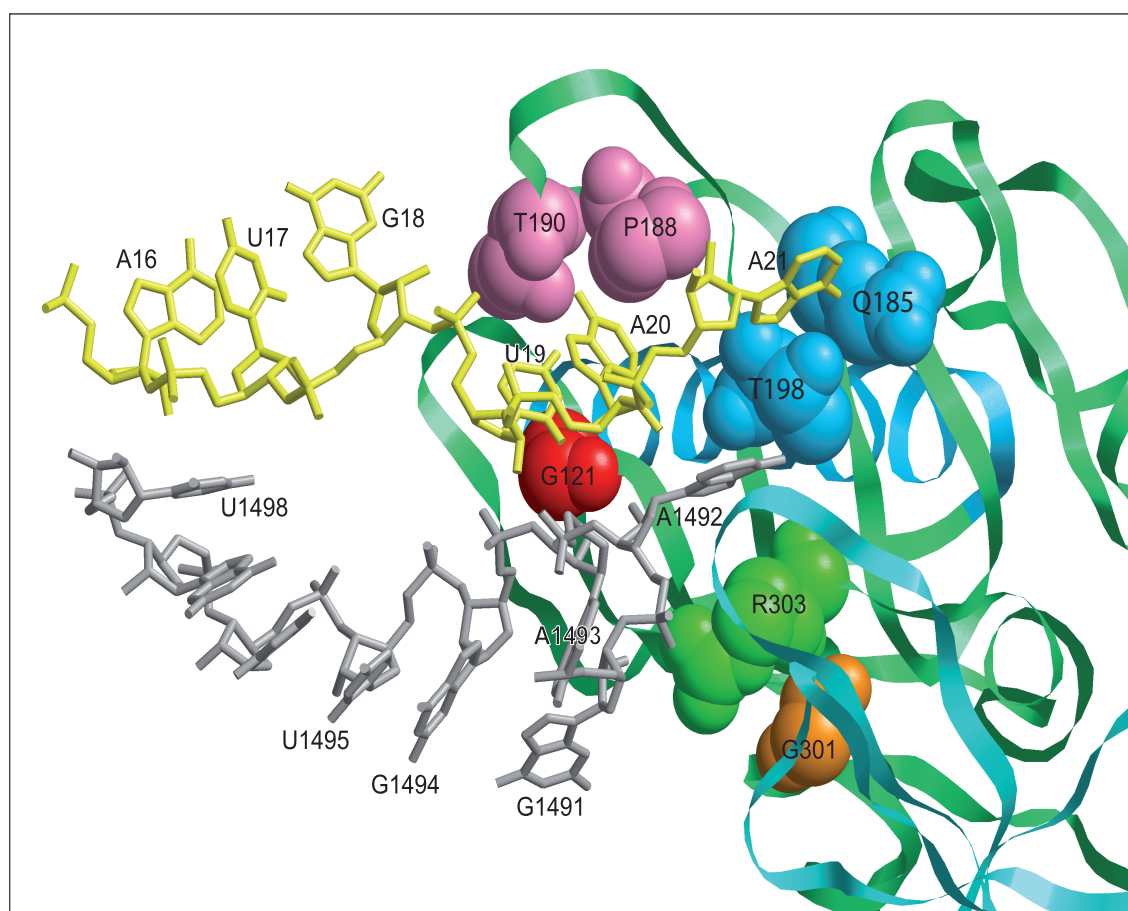


Figura 44.- Componentes ribosómicos y el ARNm cercanos a los residuos mutantes del RF1. Dichos componentes se basan en la estructura cristalina de 3,2 Å de resolución (Laurberg y col., 2008) del RF1 de *Thermotoga maritima* unido a ribosomas 70S homólogos de *E. coli* en presencia de un ARNm de pequeño tamaño (5'-GGC AAG GAG GUA AAA A16U17G18 **U19A20 A21** AAA AAA-3'; el codón de terminación se muestra en negrita, mientras que los nucleótidos 16-21 se ven en amarillo) y un ARNt-Met unido al sitio P y al E. El polipéptido del RF1 se muestra en cintas verdes (excepto la  $\alpha$ -hélice que se ve en azul), los residuos mutantes se representan en bolas (G121-rojo, G301-naranja, R303-verde), los residuos se numeran como en el RF1 de *E. coli*. Los residuos de Rf1 implicados en el reconocimiento de los codones de terminación se indican como bolas (P188 y T190 en rosa, Q185 y T198 en azul). Los nucleótidos 1491-1498 en el ARNr 16S se muestran en gris, la proteína ribosomal S12 inca como cintas turquesa.

#### *Mutantes prfA y sensibilidad a las toxinas RelE y Kid, y a antibióticos aminoglicósidos*

Los nuevos mutantes aislados muestran una extra-sensibilidad a las toxinas RelE y Kid. Los efectos de dicha extra-sensibilidad se detectaron tanto en crecimiento celular como en ensayos de síntesis de proteínas. Además, dichos efectos fueron suprimidos al sobreproducir la proteína RF1 silvestre *in vivo*. La hipersensibilidad a RelE era esperable basándose en datos anteriores. La toxina RelE ha sido previamente caracterizada como una endoribonucleasa que actúa en el contexto ribosomal induciendo cortes en el ARNm con preferencia por el codón de terminación UAG en el sitio A de ribosoma (Pedersen y col., 2003). Estos cortes conllevan una inhibición de la síntesis de proteínas. El RF1 que reconoce el codón UAG del ARNm cuando se sitúa en el sitio A del ribosoma, previene el corte del ARNm *in vitro* mediado por la proteína

RelE, protección que también se produce con el ARNt o con factores de elongación (Pedersen y col., 2003).

La estructura cristalográfica de la proteína homóloga a RelE de arqueas reveló que posee una estructura similar a la región C-terminal del factor de elongación de la traducción EF-G (Takagi y col., 2005); esta conformación podría explicar su accesibilidad al codón UAG cuando éste está situado en el sitio A del ribosoma. La protección que confiere el RF1 *in vitro* puede reflejar una competición por el mismo sustrato. Las mutaciones encontradas en RF1 pueden afectar a la competición entre el RF1 y RelE, favoreciendo que esta última proteína pueda acceder a su diana con mayor facilidad. Esta misma teoría puede explicar la extra-sensibilidad encontrada en el caso del antibiótico paromomicina y los otros aminoglicósidos analizados. Los aminoglicósidos interaccionan con la subunidad 30S en una región que solapa con el lugar de interacción del RF1. En particular, la paromomicina se une a las subunidades ribosomales 30S y esta unión desplaza los nucleótidos A1492 y A1493 de la hélice 44 del ARNr 16S. Este desplazamiento mimetiza el estado del ribosoma cargado con un aminoacil-ARNt en el sitio A del ribosoma e interfiere con la elongación de traducción (Ogle y col., 2001). El modo de acción que presentan los antibióticos kanamicina y gentamicina al unirse al ribosoma es muy similar al de la paromomicina (Francois y col., 2005). Se ha demostrado que el antibiótico paromomicina produce una inhibición competitiva de la terminación de la traducción (Youngman y col., 2007), y esto es debido a que la posición estérica que adopta el nucleótido A1493 al unirse la paromomicina impide la unión del RF1 (Laurberg y col., 2008). Por lo tanto, estos antibióticos introducen perturbaciones en la misma región del centro de reconocimiento de codones que las que realizan las mutaciones del RF1 descritas en este trabajo. La extra-sensibilidad a los antibióticos aminoglicósidos encontrada puede ser debida a una acumulación de factores que interfieran con el reconocimiento de codones de terminación por los factores de terminación de la traducción.

Los resultados de hipersensibilidad a la toxina Kid encontrados en estas cepas mutantes resultan sorprendentes a la luz de los datos obtenidos hasta la fecha. Las proteínas homólogas Kid y ChpAK (MazF) son capaces de mostrar actividad endoribonucleasa en ausencia de ribosomas (Zhang y col., 2003, Zhang y col., 2004, Munoz-Gomez y col., 2004, Munoz-Gomez y col., 2005). El mecanismo de corte de estas toxinas es similar al descrito para la ARNasa A y la ARNasa T1 (Kamphuis y col., 2006, Christensen y col., 2003). La estructura de la proteína Kid es claramente diferente a la de la proteína RelE, luego la accesibilidad de Kid al sitio A del ribosoma no parece probable. Hay que tener en cuenta que Kid es capaz de cortar el sustrato mínimo de ARN 5'-UpA-3' que forma parte de los codones de terminación UAG/A (Kamphuis y col., 2006), y que ambos son reconocidos por el factor de terminación de la traducción RF1. Quedan por aclarar los mecanismos moleculares que expliquen la hipersensibilidad a Kid encontrada en los mutantes *prfA*. Por una parte, existe la posibilidad de que se deba a interacciones directas entre Kid y el RF1 en las que ambas proteínas puedan

estar compitiendo por unirse a una región del ribosoma en la que solapen sus actividades. Otra explicación viene dada por el hecho de que una actividad reducida del RF1 puede inducir paradas del ribosoma en los codones de terminación, que a su vez producen cortes en el ARNm (Li y col., 2007). Por tanto, existe la posibilidad de que esta hipersensibilidad se deba a un incremento de dicha parada del ribosoma en los codones de terminación en la que pueda participar Kid. Cualquiera que sea el mecanismo molecular los datos indican que la hipersensibilidad a Kid de los mutantes *prfA* requiere la actividad ARNasa de la proteína, indicando que el efecto no se debe a una mera interacción con la región 30S del ribosoma, como se ha observado para la toxina Doc (Liu y col., 2008). En conjunto, parece claro que la hipersensibilidad de estos mutantes a los antibióticos aminoglicósidos y a las toxinas Kid y RelE, es un efecto específico de las mutaciones y no ocurre como consecuencia inespecífica de un estrés general en el proceso de la síntesis de proteínas. Así pues, estos datos ofrecen una evidencia preliminar de la participación del RF1 en la “ruta” de toxicidad de la proteína Kid; una posibilidad es que RF1 prevenga o atenúe el potencial de la toxina Kid de cortar el ARN sobre el sitio A del ribosoma derivando todo su potencial hacia el corte de ARN independiente del ribosoma.

Los datos muestran la primera evidencia de la interacción *in vivo* de la toxina RelE y el RF1, además de la posible participación de factores de terminación en el modo de acción de Kid. La hipersensibilidad mostrada por los mutantes *prfA* a las dos toxinas convierte a RF1 en una posible diana terapéutica. Compuestos que inhiban la actividad del RF1 pueden potenciar la actividad de los sistemas T-A como antibacterianos, además de poder activar estos sistemas en cepas que posean resistencia a antibióticos en las que el uso de antibióticos no produce efectos.

### 3 ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LA PROTEÍNA KID CON EL RIBOSOMA

A la luz de los datos obtenidos que sugieren la posible implicación del RF1 en modular la actividad tóxica de Kid, y del potencial de Kid de producir cortes en el dinucleótido UpA, y teniendo en cuenta los datos existentes de otras toxinas en los que se muestra que el ribosoma modula su acción, nos propusimos evaluar la posible interacción de Kid con el ribosoma.

#### *Corte en el ARNr inducido por las toxinas y actividad de traducción*

En primer lugar evaluamos la capacidad de la toxina de acceder al contexto ribosomal donde abundan los ARNr y que, por lo tanto, son posibles sustratos de la toxina Kid. Nuestros datos demuestran que Kid es capaz de cortar el ARNr con relativa especificidad al observarse bandas discretas derivadas del corte que parecen provenir del ARNr 18S. Los cortes en el ARNr no inactivan la actividad de los ribosomas, ya que éstos, tras la neutralización de la toxina por Kis, son capaces de sintetizar la proteína Luciferasa, tanto en eucariotas como en procariotas, al usar concentraciones de proteína que producen cortes en el ARNr. Estudios anteriores

demuestran que no todos los fragmentos del ARNr 16S producidos por la acción de la ARNasa H son capaces de inactivar el ribosoma (Afonina y col., 1991). En cambio, otras ARNasas como las ribotoxinas  $\alpha$ -sarcina o restrictocina o hirsutelina, aún produciendo un solo corte específico en el ARNr eucariota 28S, inactivan irreversiblemente el ribosoma (Lacadena y col., 2007, Yang y Moffat, 1996, Herrero-Galan y col., 2008). La toxina cromosómica homóloga a Kid de *E. coli*, ChpAK (MazF), parece incapaz de cortar el ARNr, ya que éste carece de regiones con la secuencia de corte 5'-ACA-3' (Baik y col., 2009), lo que permite que la síntesis de proteínas siga activa sobre un ARNm no procesable por ChpAK (Suzuki y col., 2005). Nuestros datos indican que cortes múltiples en ARNr mediados por una interferasa microbiana no inactivan necesariamente el ribosoma

### *Ensayos de interacción de la toxina Kid y el ribosoma*

En un intento por detectar interacciones directas de Kid con el ribosoma, construimos una proteína de fusión con la proteína fluorescente EYFP. Dicha fusión traduccional fue apta para estudios *in vivo* ya que, por una parte, se conserva la capacidad de emitir fluorescencia de la EYFP al excitarla a la longitud de onda adecuada, y por otra, la toxina Kid fusionada fue capaz de producir la inhibición del crecimiento de las células en las que se sobreprodujo, de un modo similar a la proteína Kid libre. Aunque se detecta una ligera disminución de la toxicidad en la cepa productora de la proteína de fusión en comparación con la proteína Kid silvestre, este efecto es atribuible a la presencia de la proteína de mayor tamaño EYFP. En conjunto, estos datos sugieren que la proteína de fusión puede ser usada en posteriores estudios de interacciones *in vivo* de la toxina Kid.

En este momento, nos propusimos evaluar la interacción con los ribosomas mediante el análisis de los perfiles ribosomales en los que, tras un gradiente de sacarosa del 5 al 40 %, se consigue la separación de los ribosomas del extracto en las subunidades 30S, 50S, 70S y en polisomas. Este tipo de ensayo se ha llevado a cabo anteriormente con otras toxinas para detectar su unión al ribosoma (Prysak y col., 2009, Liu y col., 2008). La separación de las fases del gradiente permite obtener fracciones ricas en las diferentes subunidades ribosomales. Dichas fracciones pueden ser analizadas para la detección de la proteína tanto por *Western blot* como por técnicas fluorimétricas. En nuestro caso elegimos esta última aproximación, tras descartar la primera debido a problemas asociados a la baja especificidad del anticuerpo disponible. En el análisis realizado no se detectaron diferencias en los valores de emisión de fluorescencia de las fracciones que contenían Kid-EYFP con respecto a los controles con EYFP, tanto en la cepa silvestre MC1061, como en la cepa hipersensible KR19. Estos resultados pueden explicarse de dos modos: i) Kid no se une al ribosoma en ningún momento, o ii) la interacción entre Kid y el ribosoma es débil y el gradiente de sacarosa la deshace. Basándonos en datos anteriores obtenidos en este trabajo, postulamos que puede existir interacción de Kid con el ribosoma ya que es capaz de producir cortes en el ARNr, lo que la sitúa en el entorno ribosomal. Si existe

una interacción débil con el ribosoma parece lógico pensar que la actividad toxica mayoritaria de Kid se deba a la depleción de los ARNm celulares no localizados en el contexto ribosomal. Sin embargo, puede que exista una actividad residual de la proteína en la cual el ribosoma esté implicado, pero cuya detección requiera de ensayos que preserven la débil interacción proteína-ribosoma. En ensayos futuros, pensamos que podría seguir usándose la emisión de fluorescencia en la detección y cuantificación de dicha interacción por otros procedimientos que preserven interacciones débiles, debido a la elevada sensibilidad del ensayo.

Como alternativa a la fusión con la EYFP decidimos marcar la toxina Kid con Alexa Fluor 488 en una cisteína. Este marcaje es atractivo pues permite hacer estudios de interacción *in vitro* y reduce substancialmente el tamaño del fluoróforo. En la primera aproximación escogimos eliminar la cisteína interna, C74, de Kid para evitar que se formasen puentes disulfuro y poder aumentar la eficiencia de marcaje, por lo que introdujimos otra cisteína en el extremo C-terminal de la proteína, C111. Los estudios de la actividad inhibidora de síntesis de proteínas demuestran que la sustitución de la cisteína 74 por histidina no afecta a la actividad de la proteína. Sin embargo, la introducción de la cisteína en el extremo C-terminal provoca que la proteína se inactive, inactivación que es mayor al llevar a cabo el marcaje con Alexa 488. Los estudios estructurales demuestran que la proteína marcada ha cambiado ampliamente su estabilidad térmica. Por lo tanto, la proteína KidC74C111-Alexa fue desechada para su utilización *in vitro*.

El marcaje con Alexa 488 de la proteína Kid silvestre dio lugar a una proteína capaz de inhibir la síntesis de proteínas y el crecimiento celular. Esta proteína marcada interacciona y es neutralizada por la antitoxina. El análisis mediante DC indicó además que posee un patrón estructural y una  $T_m$  similar a la proteína silvestre. Por lo tanto, esta proteína parece un buen candidato para los próximos estudios de interacción proteína-ribosoma *in vitro*. Si esta interacción existe, la proteína marcada con el fluoróforo nos permitirá definir los parámetros bioquímicos de la interacción con el ribosoma o con otros posibles factores que intervengan en el mecanismo de acción de Kid, incluido el factor de terminación RF1.





## VIII. CONCLUSIONES



General conclusions obtained performing this experimental work are described hereafter.

Related to the first results chapter, *Validation of the RNA binding and cleavage model of Kid toxin*, the main conclusions are:

- Kid accumulates spontaneous mutations at the 5' end of the protein that lead to unstable or inactive proteins.
- Kid mutations D75E, D75N, H17P, R73H, T46G, A55G and T69G do not affect the interactions with the antitoxin Kis, their capacity to bind to the promoter region or the coregulation of the system.
- Kid mutants KidT46G, KidA55G, KidT69G that affect residues proposed to interact with the bases of the core, and KidR85W which affects a region involved in general binding have been characterized. These mutants show a reduced binding activity.
- Kid A55G and Kid T69G maintain a reduced but clear potential to cleave RNA.
- Mutations in these residues do not alter the RNA cleavage specificity of the wild-type protein.
- Residue R85 is involved in RNA binding as the KidR85W mutant binds very poorly to the RNA substrate. This mutant has a greatly reduced, but detectable, RNA cleavage activity on larger RNA substrates but is inactive as RNase in cell extracts
- KidT46G has a reduced RNA binding activity similar to A55G and T69G mutations, indicating that T46 plays a role in RNA binding. In addition this residue could have an important role in the RNA catalysis as the KidT46G mutation inactivates the RNase activity of the toxin.
- Mutations R73H, D75N, D75E and H17P in residues that define the proposed catalytic site of the toxin have been characterized. Mutations affecting these residues do not alter substantially the RNA binding potential of the toxin but inactivate the RNase activity of the toxin.
- RNA bases flanking the core sequence 5'-UAC-3' influence RNA cleavage efficiency but do not affect the cleavage specificity.

On the whole the RNA binding and RNA cleavage assays of Kid mutants in residues proposed to play a role in specific binding to RNA or RNA cleavage support the predictions of the model.

The main conclusions related to the characterization of novel RF1 mutants and their involvement in the activity of *Kid* as protein synthesis inhibitor are as follows:

- Using an amber mutation in the gene of the antitoxin of the *parD* (*kis*, *kid*) operon, novel RF1 mutants were previously isolated.
- Mutations G121S, G301S and R303S in the *prfA* gene, encoding the releasing factor

RF1, affect its termination efficiency without disrupting its protein stability and cause readthrough of amber mutations. Readthrough of the amber mutation in *kis* restores the antitoxin function of this protein.

- The *prfA* mutants are extra-sensitive to the RelE toxin: this provides *in vivo* evidence for a functional interaction between the RelE toxin and the RF1 protein.
- Unexpectedly, the *prfA* mutants are also extra-sensitive to the Kid toxin that at difference to RelE can cleave RNA in the absence of ribosomes. This extrasensitivity is dependent on the RNase activity of the toxin and shows that RF1 plays a role in the cytotoxicity pathway of the Kid toxin.
- The *prfA* mutants are especially sensitive to several aminoglycoside antibiotics interfering with the recognition of sense and stop codons.
- The results indicate that targeting and partially inactivating *prfA* opens possibilities to increase the antibacterial activity of some RNase toxins and aminoglycoside antibiotics.

The use of novel *prfA* mutants has provided the first *in vivo* evidence of the interaction of RelE and RF1, and of the possible participation this factor in the pathway of Kid toxicity.

From the third chapter, *Studies of interactions between Kid and the ribosomes*, the main results are:

- Kid cleaves ribosomal RNA without great specificity. These cleavages do not inactivate ribosomes as the translation can proceed when the toxin is neutralised by Kis.
- A fluorescent *in vivo* Kid protein, EYFP-Kid, has been obtained. This fused protein conserve the functional role of each component: as Kid it can inhibit protein synthesis and as EYFP fluoresces when it is appropriately excited.
- *In vivo* interactions of EYFP-Kid with the ribosome can not be detected in fractions of ribosome profiles, suggesting weak interactions or absence of them.
- A fluorescent Kid protein has been produced by coupling Kid protein and the fluorophore Alexa 488. Kid-Alexa conserves the ability to inhibit protein synthesis and the fluorescence of Alexa 488. This protein would be used in the future to study *in vitro* interactions of the protein with the ribosome or the RF1 protein.

As summary, Kid cleaves rRNA without disrupting protein synthesis machinery. Kid:ribosome interactions *in vivo* have not been detected using a version of the toxin bound to the fluorescent EYFP protein. A functional fluorescent Kid-Alexa protein has been produced for future *in vitro* assays to evaluate those possible interactions.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**



- Afonina, E., N. Chichkova, S. Bogdanova y A. Bogdanov, (1991) 30S ribosomal subunits with fragmented 16S RNA: a new approach for structure and function study of ribosomes. *Biochimie* **73**: 777-787.
- Aizenman, E., H. Engelberg\_Kulka y G. Glaser, (1996) An Escherichia coli chromosomal "addiction module" regulated by guanosine 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6059-6063.
- Alanis, A. J., (2005) Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of medical research* **36**: 697-705.
- Alexander, C., N. Bilgin, C. Lindschau, J. R. Mesters, B. Kraal, R. Hilgenfeld, V. A. Erdmann y C. Lippmann, (1995) Phosphorylation of elongation factor Tu prevents ternary complex formation. *J Biol Chem* **270**: 14541-14547.
- Anantharaman, V. y L. Aravind, (2003) New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome Biol* **4**: R81.
- Bahassi, E. M., M. A. Salmon, L. Van\_Melderen, P. Bernard y M. Couturier, (1995) F plasmid CcdB killer protein: ccdB gene mutants coding for non-cytotoxic proteins which retain their regulatory functions. *Mol Microbiol* **15**: 1031-1037.
- Baik, S., K. Inoue, M. Ouyang y M. Inouye, (2009) Significant bias against ACA triplet in tmRNA sequence of Escherichia coli K12. *J Bacteriol.*
- Balaban, N. Q., J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik y S. Leibler, (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**: 1622-1625.
- Banerjee, P. C., (2004) Genetics of metal resistance in acidophilic prokaryotes of acidic mine environments. *Indian journal of experimental biology* **42**: 9-25.
- Baranov, P. V., R. F. Gesteland y J. F. Atkins, (2002) Release factor 2 frameshifting sites in different bacteria. *EMBO Rep* **3**: 373-377.
- Bennett, P. M., (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology* **153 Suppl 1**: S347-357.
- Bernard, P. y M. Couturier, (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**: 735-745.
- Bigger, J., (1944) TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet* **244**: 497-500.
- Birnboim, H. C. y J. Doly, (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Blaby, I. K. y D. K. Summers, (2009) The Role of FIS in the Rcd Checkpoint and Stable Maintenance of Plasmid ColE1. *Microbiology.*
- Black, D. S., B. Irwin y H. S. Moyed, (1994) Autoregulation of hip, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol* **176**: 4081-4091.



- Black, D. S., A. J. Kelly, M. J. Mardis y H. S. Moyed, (1991) Structure and organization of hip, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol* **173**: 5732-5739.
- Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker y H. W. Boyer, (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.
- Bouet, J. Y., M. Bouvier y D. Lane, (2006) Concerted action of plasmid maintenance functions: partition complexes create a requirement for dimer resolution. *Mol Microbiol* **62**: 1447-1459.
- Bravo, A., G. de Torrontegui y R. Diaz, (1987) Identification of components of a new stability system of plasmid R1, ParD, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol Gen Genet* **210**: 101-110.
- Bravo, A., S. Ortega, G. de Torrontegui y R. Diaz, (1988) Killing of Escherichia coli cells modulated by components of the stability system ParD of plasmid R1. *Mol Gen Genet* **215**: 146-151.
- Budde, P. P., B. M. Davis, J. Yuan y M. K. Waldor, (2007) Characterization of a higBA toxin-antitoxin locus in Vibrio cholerae. *J Bacteriol* **189**: 491-500.
- Buts, L., J. Lah, M. H. Dao-Thi, L. Wyns y R. Loris, (2005) Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends in biochemical sciences* **30**: 672-679.
- Casadaban, M. J. y S. N. Cohen, (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in Escherichia coli. *J Mol Biol* **138**: 179-207.
- Cooper, T. F. y J. A. Heinemann, (2000) Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12643-12648.
- Correia, F. F., A. D'Onofrio, T. Rejtar, L. Li, B. L. Karger, K. Makarova, E. V. Koonin y K. Lewis, (2006) Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in Escherichia coli. *J Bacteriol* **188**: 8360-8367.
- Curran, J. F. y M. Yarus, (1989) Rates of aminoacyl-tRNA selection at 29 sense codons in vivo. *J Mol Biol* **209**: 65-77.
- Cherny, I. y E. Gazit, (2004) The YefM antitoxin defines a family of natively unfolded proteins: implications as a novel antibacterial target. *J Biol Chem* **279**: 8252-8261.
- Cherny, I., L. Rockah y E. Gazit, (2005) The YoeB toxin is a folded protein that forms a physical complex with the unfolded YefM antitoxin. Implications for a structural-based differential stability of toxin-antitoxin systems. *J Biol Chem* **280**: 30063-30072.
- Chopra, I. y M. Roberts, (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 232-260 ; second page, table of contents.
- Christensen-Dalsgaard, M. y K. Gerdes, (2006) Two higBA loci in the Vibrio cholerae

- superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. *Mol Microbiol* **62**: 397-411.
- Christensen-Dalsgaard, M. y K. Gerdes, (2008) Translation affects YoeB and MazF messenger RNA interferase activities by different mechanisms. *Nucleic Acids Res* **36**: 6472-6481.
- Christensen, S. K. y K. Gerdes, (2003) RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Mol Microbiol* **48**: 1389-1400.
- Christensen, S. K. y K. Gerdes, (2004) Delayed-relaxed response explained by hyperactivation of RelE. *Mol Microbiol* **53**: 587-597.
- Christensen, S. K., G. Maenhaut-Michel, N. Mine, S. Gottesman, K. Gerdes y L. Van Melderen, (2004) Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. *Mol Microbiol* **51**: 1705-1717.
- Christensen, S. K., M. Mikkelsen, K. Pedersen y K. Gerdes, (2001) RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14328-14333.
- Christensen, S. K., K. Pedersen, F. G. Hansen y K. Gerdes, (2003) Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J Mol Biol* **332**: 809-819.
- Dahlgren, A. y M. Ryden-Aulin, (2004) Effects of two cis-acting mutations on the regulation and expression of release factor one in *Escherichia coli*. *Biochimie* **86**: 431-438.
- Daines, D. A., M. H. Wu y S. Y. Yuan, (2007) VapC-1 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a ribonuclease. *J Bacteriol* **189**: 5041-5048.
- Davison, J., (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**: 73-91.
- de Feyter, R., C. Wallace y D. Lane, (1989) Autoregulation of the ccd operon in the F plasmid. *Mol Gen Genet* **218**: 481-486.
- de la Cueva-Mendez, G., A. D. Mills, L. Clay-Farrace, R. Diaz-Orejas y R. A. Laskey, (2003) Regulatable killing of eukaryotic cells by the prokaryotic proteins Kid and Kis. *EMBO J* **22**: 246-251.
- de la Hoz, A. B., S. Ayora, I. Sitkiewicz, S. Fernandez, R. Pankiewicz, J. C. Alonso y P. Ceglowski, (2000) Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 728-733.
- del Solar, G., J. C. Alonso, M. Espinosa y R. Diaz-Orejas, (1996) Broad-host-range plasmid replication: an open question. *Mol Microbiol* **21**: 661-666.
- Diago-Navarro, E., M. B. Kamphuis, R. Boelens, A. Barendregt, A. J. Heck, R. H. van den Heuvel y R. Diaz-Orejas, (2009a) A mutagenic analysis of the RNase mechanism of the bacterial Kid toxin by mass spectrometry. *The FEBS journal* **276**: 4973-4986.
- Diago-Navarro, E., L. Mora, R. H. Buckingham, R. Diaz-Orejas y M. Lemonnier, (2009b) Novel *Escherichia coli* RF1 mutants with decreased translation termination activity and

- increased sensitivity to the cytotoxic effect of the bacterial toxins Kid and RelE. *Mol Microbiol* **71**: 66-78.
- Diderichsen, B., N. P. Fiil y R. Lavalley, (1977) Genetics of the relB locus in Escherichia coli. *J Bacteriol* **131**: 30-33.
- Donachie, W. D., K. J. Begg y M. Vicente, (1976) Cell length, cell growth and cell division. *Nature* **264**: 328-333.
- Dower, W. J., J. F. Miller y C. W. Ragsdale, (1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Elliott, T., (1989) Cloning, genetic characterization, and nucleotide sequence of the hemA-prfA operon of Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* **171**: 3948-3960.
- Engelberg-Kulka, H., S. Amitai, I. Kolodkin-Gal y R. Hazan, (2006) Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS genetics* **2**: e135.
- Engelberg-Kulka, H. y G. Glaser, (1999) Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol* **53**: 43-70.
- Falla, T. J. y I. Chopra, (1999) Stabilization of Rhizobium symbiosis plasmids. *Microbiology* **145** ( Pt 3): 515-516.
- Fernandez De Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori y R. Woodgate, (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **35**: 1560-1572.
- Fozo, E. M., M. R. Hemm y G. Storz, (2008) Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 579-589, Table of Contents.
- Francois, B., R. J. Russell, J. B. Murray, F. Aboul-ela, B. Masquida, Q. Vicens y E. Westhof, (2005) Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res* **33**: 5677-5690.
- Freistroffer, D. V., M. Kwiatkowski, R. H. Buckingham y M. Ehrenberg, (2000) The accuracy of codon recognition by polypeptide release factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2046-2051.
- Freistroffer, D. V., M. Y. Pavlov, J. MacDougall, R. H. Buckingham y M. Ehrenberg, (1997) Release factor RF3 in E.coli accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. *EMBO J* **16**: 4126-4133.
- Frolova, L. Y., R. Y. Tsivkovskii, G. F. Sivolobova, N. Y. Oparina, O. I. Serpinsky, V. M. Blinov, S. I. Tatkov y L. L. Kisselev, (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *Rna* **5**: 1014-1020.
- Funnell, B. E., (2005) Partition-mediated plasmid pairing. *Plasmid* **53**: 119-125.
- Galvani, C., J. Terry y E. E. Ishiguro, (2001) Purification of the RelB and RelE proteins of Escherichia coli: RelE binds to RelB and to ribosomes. *J Bacteriol* **183**: 2700-2703.

- Gao, H., Z. Zhou, U. Rawat, C. Huang, L. Bouakaz, C. Wang, Z. Cheng, Y. Liu, A. Zavialov, R. Gursky, S. Sanyal, M. Ehrenberg, J. Frank y H. Song, (2007a) RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for dissociation of class I release factors. *Cell* **129**: 929-941.
- Gao, N., A. V. Zavialov, M. Ehrenberg y J. Frank, (2007b) Specific interaction between EF-G and RRF and its implication for GTP-dependent ribosome splitting into subunits. *J Mol Biol* **374**: 1345-1358.
- Garcia-Pino, A., M. Christensen-Dalsgaard, L. Wyns, M. Yarmolinsky, R. D. Magnuson, K. Gerdes y R. Loris, (2008) Doc of prophage P1 is inhibited by its antitoxin partner Phd through fold complementation. *J Biol Chem* **283**: 30821-30827.
- Garcillan-Barcia, M. P., M. V. Francia y F. de la Cruz, (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS microbiology reviews* **33**: 657-687.
- Gazit, E. y R. T. Sauer, (1999) The Doc toxin and Phd antidote proteins of the bacteriophage P1 plasmid addiction system form a heterotrimeric complex. *J Biol Chem* **274**: 16813-16818.
- Gerdes, K., (2000) Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J Bacteriol* **182**: 561-572.
- Gerdes, K., S. K. Christensen y A. Lobner-Olsen, (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 371-382.
- Gerdes, K., P. B. Rasmussen y S. Molin, (1986) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 3116-3120.
- Gerdes, K. y E. G. Wagner, (2007) RNA antitoxins. *Curr Opin Microbiol* **10**: 117-124.
- Gogos, A., H. Mu, F. Bahna, C. A. Gomez y L. Shapiro, (2003) Crystal structure of YdcE protein from *Bacillus subtilis*. *Proteins* **53**: 320-322.
- Gotfredsen, M. y K. Gerdes, (1998) The *Escherichia coli* relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol Microbiol* **29**: 1065-1076.
- Grady, R. y F. Hayes, (2003) Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Mol Microbiol* **47**: 1419-1432.
- Green, R. y H. F. Noller, (1997) Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* **66**: 679-716.
- Gronlund, H. y K. Gerdes, (1999) Toxin-antitoxin systems homologous with relBE of *Escherichia coli* plasmid P307 are ubiquitous in prokaryotes. *J Mol Biol* **285**: 1401-1415.
- Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson y J. Beckwith, (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-4130.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.

- Hansen, J. L., P. B. Moore y T. A. Steitz, (2003) Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* **330**: 1061-1075.
- Hargreaves, D., R. Giraldo, S. Santos-Sierra, R. Boelens, D. W. Rice, R. Díaz-Orejas y J. B. Rafferty, (2002a) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the parD-encoded protein Kid from Escherichia coli plasmid R1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 355-358.
- Hargreaves, D., S. Santos-Sierra, R. Giraldo, R. Sabariego-Jareño, G. de la Cueva-Mendez, R. Boelens, R. Díaz-Orejas y J. B. Rafferty, (2002b) Structural and functional analysis of the kid toxin protein from E. coli plasmid R1. *Structure* **10**: 1425-1433.
- Harrison, J. J., W. D. Wade, S. Akierman, C. Vacchi-Suzzi, C. A. Stremick, R. J. Turner y H. Ceri, (2009) The chromosomal toxin gene yafQ is a determinant of multidrug tolerance for Escherichia coli growing in a biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**: 2253-2258.
- Hartz, D., J. Binkley, T. Hollingsworth y L. Gold, (1990) Domains of initiator tRNA and initiation codon crucial for initiator tRNA selection by Escherichia coli IF3. *Genes y development* **4**: 1790-1800.
- Hayes, C. S. y R. T. Sauer, (2003) Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translational quality control. *Mol Cell* **12**: 903-911.
- Hayes, F., (2003) Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* **301**: 1496-1499.
- Hazan, R., B. Sat y H. Engelberg-Kulka, (2004) Escherichia coli mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J Bacteriol* **186**: 3663-3669.
- Hazan, R., B. Sat, M. Reches y H. Engelberg-Kulka, (2001) Postsegregational killing mediated by the P1 phage "addiction module" phd-doc requires the Escherichia coli programmed cell death system mazEF. *J Bacteriol* **183**: 2046-2050.
- Heck, A. J., (2008) Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nature methods* **5**: 927-933.
- Herrero-Galan, E., J. Lacadena, A. Martínez del Pozo, D. G. Boucias, N. Olmo, M. Onaderra y J. G. Gavilanes, (2008) The insecticidal protein hirsutellin A from the mite fungal pathogen Hirsutella thompsonii is a ribotoxin. *Proteins* **72**: 217-228.
- Hiraga, S., (1992) Chromosome and plasmid partition in Escherichia coli. *Annu Rev Biochem* **61**: 283-306.
- Hiraga, S., A. Jaffe, T. Ogura, H. Mori y H. Takahashi, (1986) F plasmid ccd mechanism in Escherichia coli. *J Bacteriol* **166**: 100-104.
- Ito, K., M. Uno y Y. Nakamura, (2000) A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* **403**: 680-684.
- Jaffe, A., T. Ogura y S. Hiraga, (1985) Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. *J Bacteriol* **163**: 841-849.



- Jiang, W., Y. Hou y M. Inouye, (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem* **272**: 196-202.
- Jiang, Y., J. Pogliano, D. R. Helinski y I. Konieczny, (2002) ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol Microbiol* **44**: 971-979.
- Kamada, K. y F. Hanaoka, (2005) Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol Cell* **19**: 497-509.
- Kamada, K., F. Hanaoka y S. K. Burley, (2003) Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol Cell* **11**: 875-884.
- Kamphuis, M. B., A. M. Bonvin, M. C. Monti, M. Lemonnier, A. Munoz-Gomez, R. H. van den Heuvel, R. Diaz-Orejas y R. Boelens, (2006) Model for RNA binding and the catalytic site of the RNase Kid of the bacterial parD toxin-antitoxin system. *J Mol Biol* **357**: 115-126.
- Kamphuis, M. B., M. C. Monti, R. H. van den Heuvel, S. Santos-Sierra, G. E. Folkers, M. Lemonnier, R. Diaz-Orejas, A. J. Heck y R. Boelens, (2007) Interactions between the toxin kid of the bacterial parD system and the antitoxins Kis and MazE. *Proteins*.
- Karimi, R., M. Y. Pavlov, R. H. Buckingham y M. Ehrenberg, (1999) Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol Cell* **3**: 601-609.
- Keren, I., D. Shah, A. Spoering, N. Kaldalu y K. Lewis, (2004) Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 8172-8180.
- Kolodkin-Gal, I. y H. Engelberg-Kulka, (2009) The stationary-phase sigma factor sigma(S) is responsible for the resistance of *Escherichia coli* stationary-phase cells to mazEF-mediated cell death. *J Bacteriol* **191**: 3177-3182.
- Kolodkin-Gal, I., R. Hazan, A. Gaathon, S. Carmeli y H. Engelberg-Kulka, (2007) A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for mazEF-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science* **318**: 652-655.
- Korch, S. B., T. A. Henderson y T. M. Hill, (2003) Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol* **50**: 1199-1213.
- Kotra, L. P., J. Haddad y S. Mobashery, (2000) Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**: 3249-3256.
- Kristoffersen, P., G. B. Jensen, K. Gerdes y J. Piskur, (2000) Bacterial toxin-antitoxin gene system as containment control in yeast cells. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5524-5526.

- Lacadena, J., E. Alvarez-Garcia, N. Carreras-Sangra, E. Herrero-Galan, J. Alegre-Cebollada, L. Garcia-Ortega, M. Onaderra, J. G. Gavilanes y A. Martinez del Pozo, (2007) Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers. *FEMS microbiology reviews* **31**: 212-237.
- Lacadena, J., A. Martinez del Pozo, V. Lacadena, A. Martinez-Ruiz, J. M. Mancheno, M. Onaderra y J. G. Gavilanes, (1998) The cytotoxin alpha-sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS Lett* **424**: 46-48.
- Laurberg, M., H. Asahara, A. Korostelev, J. Zhu, S. Trakhanov y H. F. Noller, (2008) Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* **454**: 852-857.
- Lavalle, R., (1965) New mutants for regulation of RNA synthesis. *Bulletin de la Societe de chimie biologique* **47**: 1567-1570.
- Lederberg, E. M. y S. N. Cohen, (1974) Transformation of Salmonella typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119**: 1072-1074.
- Lehnherr, H., E. Maguin, S. Jafri y M. B. Yarmolinsky, (1993) Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained. *J Mol Biol* **233**: 414-428.
- Lehnherr, H. y M. B. Yarmolinsky, (1995) Addiction protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3274-3277.
- Lemonnier, M., J. Y. Bouet, V. Libante y D. Lane, (2000) Disruption of the F plasmid partition complex in vivo by partition protein SopA. *Mol Microbiol* **38**: 493-505.
- Lemonnier, M., S. Santos-Sierra, C. Pardo-Abarrio y R. Diaz-Orejas, (2004) Identification of residues of the kid toxin involved in autoregulation of the parD system. *J Bacteriol* **186**: 240-243.
- Lewis, K., (2005) Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry* **70**: 267-274.
- Li, G. Y., Y. Zhang, M. Inouye y M. Ikura, (2008) Structural mechanism of transcriptional autorepression of the Escherichia coli RelB/RelE antitoxin/toxin module. *J Mol Biol* **380**: 107-119.
- Li, X., T. Yokota, K. Ito, Y. Nakamura y H. Aiba, (2007) Reduced action of polypeptide release factors induces mRNA cleavage and tmRNA tagging at stop codons in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **63**: 116-126.
- Lioy, V. S., M. T. Martin, A. G. Camacho, R. Lurz, H. Antelmann, M. Hecker, E. Hitchin, Y. Ridge, J. M. Wells y J. C. Alonso, (2006) pSM19035-encoded zeta toxin induces stasis followed by death in a subpopulation of cells. *Microbiology* **152**: 2365-2379.
- Lippmann, C., C. Lindschau, E. Vijgenboom, W. Schroder, L. Bosch y V. A. Erdmann, (1993) Prokaryotic elongation factor Tu is phosphorylated in vivo. *J Biol Chem* **268**: 601-607.



- Liu, M., Y. Zhang, M. Inouye y N. A. Woychik, (2008) Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5885-5890.
- Llosa, M., F. X. Gomis-Ruth, M. Coll y F. de la Cruz Fd, (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**: 1-8.
- Magnuson, R., H. Lehnherr, G. Mukhopadhyay y M. B. Yarmolinsky, (1996) Autoregulation of the plasmid addiction operon of bacteriophage P1. *J Biol Chem* **271**: 18705-18710.
- Magnuson, R. y M. B. Yarmolinsky, (1998) Corepression of the P1 addiction operon by Phd and Doc. *J Bacteriol* **180**: 6342-6351.
- Makarova, K. S., Y. I. Wolf y E. V. Koonin, (2009) Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biology direct* **4**: 19.
- Masuda, Y., K. Miyakawa, Y. Nishimura y E. Ohtsubo, (1993) chpA and chpB, Escherichia coli chromosomal homologs of the pem locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. *J Bacteriol* **175**: 6850-6856.
- Mazel, D., (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature reviews* **4**: 608-620.
- McKinley, J. E. y R. D. Magnuson, (2005) Characterization of the Phd repressor-antitoxin boundary. *J Bacteriol* **187**: 765-770.
- Meinhart, A., C. Alings, N. Strater, A. G. Camacho, J. C. Alonso y W. Saenger, (2001) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the epsilonzeta addiction system encoded by Streptococcus pyogenes plasmid pSM19035. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**: 745-747.
- Miller, E. M. y J. A. Nickoloff, (1995) Escherichia coli electrotransformation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* **47**: 105-113.
- Miller, J., (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*.
- Mine, N., J. Guglielmini, M. Wilbaux y L. Van Melderen, (2009) The decay of the chromosomally encoded ccdO157 toxin-antitoxin system in the Escherichia coli species. *Genetics* **181**: 1557-1566.
- Monti, M. C., A. M. Hernandez-Arriaga, M. B. Kamphuis, J. Lopez-Villarejo, A. J. Heck, R. Boelens, R. Diaz-Orejas y R. H. van den Heuvel, (2007) Interactions of Kid-Kis toxin-antitoxin complexes with the parD operator-promoter region of plasmid R1 are piloted by the Kis antitoxin and tuned by the stoichiometry of Kid-Kis oligomers. *Nucleic Acids Res* **35**: 1737-1749.
- Mora, L., V. Heurgue-Hamard, M. de Zamaroczy, S. Kervestin y R. H. Buckingham, (2007) Methylation of bacterial release factors RF1 and RF2 is required for normal translation termination in vivo. *J Biol Chem* **282**: 35638-35645.

- Mosteller, R. D., (1978) Evidence that glucose starvation-sensitive mutants are altered in the relB locus. *J Bacteriol* **133**: 1034-1037.
- Motiejunaite, R., J. Armalyte, A. Markuckas y E. Suziedeliene, (2007) Escherichia coli dinJ-yafQ genes act as a toxin-antitoxin module. *FEMS Microbiol Lett* **268**: 112-119.
- Moyed, H. S. y K. P. Bertrand, (1983) hipA, a newly recognized gene of Escherichia coli K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* **155**: 768-775.
- Munoz-Gomez, A. J., M. Lemonnier, S. Santos-Sierra, A. Berzal-Herranz y R. Diaz-Orejas, (2005) RNase/anti-RNase activities of the bacterial parD toxin-antitoxin system. *J Bacteriol* **187**: 3151-3157.
- Munoz-Gomez, A. J., S. Santos-Sierra, A. Berzal-Herranz, M. Lemonnier y R. Diaz-Orejas, (2004) Insights into the specificity of RNA cleavage by the Escherichia coli MazF toxin. *FEBS Lett* **567**: 316-320.
- Nariya, H. y M. Inouye, (2008) MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular Myxococcus development. *Cell* **132**: 55-66.
- Nieto, C., T. Pellicer, D. Balsa, S. K. Christensen, K. Gerdes y M. Espinosa, (2006) The chromosomal relBE2 toxin-antitoxin locus of Streptococcus pneumoniae: characterization and use of a bioluminescence resonance energy transfer assay to detect toxin-antitoxin interaction. *Mol Microbiol* **59**: 1280-1296.
- Nordstrom, K., (2006) Plasmid R1--replication and its control. *Plasmid* **55**: 1-26.
- Nyborg, J. y A. Liljas, (1998) Protein biosynthesis: structural studies of the elongation cycle. *FEBS Lett* **430**: 95-99.
- Ogle, J. M., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter y V. Ramakrishnan, (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**: 897-902.
- Ogle, J. M. y V. Ramakrishnan, (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* **74**: 129-177.
- Overgaard, M., J. Borch, M. G. Jorgensen y K. Gerdes, (2008) Messenger RNA interferase RelE controls relBE transcription by conditional cooperativity. *Mol Microbiol* **69**: 841-857.
- Pace, C. N. y J. M. Scholtz, (1997) *Measuring the conformational stability of a protein*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Pandey, D. G., K., (2005) Toxin- antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* **55**: 78-89.
- Pape, T., W. Wintermeyer y M. V. Rodnina, (1998) Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the E. coli ribosome. *EMBO J* **17**: 7490-7497.
- Pedersen, K., S. K. Christensen y K. Gerdes, (2002) Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol Microbiol* **45**: 501-510.

- Pedersen, K., A. V. Zavialov, M. Y. Pavlov, J. Elf, K. Gerdes y M. Ehrenberg, (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* **112**: 131-140.
- Perez\_Ruiz, M., D. Sievers, P. A. Garcia\_Lopez y A. Berzal\_Herranz, (1999) The antisense sequence of the HIV-1 TAR stem-loop structure covalently linked to the hairpin ribozyme enhances its catalytic activity against two artificial substrates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**: 33-42.
- Persson, C., E. G. Wagner y K. Nordstrom, (1988) Control of replication of plasmid R1: kinetics of in vitro interaction between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT. *EMBO J* **7**: 3279-3288.
- Peske, F., M. V. Rodnina y W. Wintermeyer, (2005) Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis. *Mol Cell* **18**: 403-412.
- Petry, S., D. E. Brodersen, F. V. t. Murphy, C. M. Dunham, M. Selmer, M. J. Tarry, A. C. Kelley y V. Ramakrishnan, (2005) Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. *Cell* **123**: 1255-1266.
- Petry, S., A. Weixlbaumer y V. Ramakrishnan, (2008) The termination of translation. *Current opinion in structural biology* **18**: 70-77.
- Pimentel, B., M. A. Madine y G. de la Cueva-Mendez, (2005) Kid cleaves specific mRNAs at UUACU sites to rescue the copy number of plasmid R1. *EMBO J* **24**: 3459-3469.
- Poole, E. S., C. M. Brown y W. P. Tate, (1995) The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in Escherichia coli. *EMBO J* **14**: 151-158.
- Projan, S. J., S. Carleton y R. P. Novick, (1983) Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid* **9**: 182-190.
- Prysak, M. H., C. J. Mozdierz, A. M. Cook, L. Zhu, Y. Zhang, M. Inouye y N. A. Woychik, (2009) Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Mol Microbiol* **71**: 1071-1087.
- Ramakrishnan, V., (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**: 557-572.
- Ronen, A., (1980) 2-Aminopurine. *Mutat Res* **75**: 1-47.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, L. Biskri, P. Bouige y D. Mazel, (2003) Comparative analysis of superintegrans: engineering extensive genetic diversity in the Vibrionaceae. *Genome Res* **13**: 428-442.
- Ruiz-Echevarria, M. J., G. de-la-Cueva y R. Diaz-Orejas, (1995a) Translational coupling and limited degradation of a polycistronic messenger modulate differential gene expression in the parD stability system of plasmid R1. *Mol Gen Genet* **248**: 599-609.

- Ruiz-Echevarria, M. J., M. A. de-la-Torre y R. Diaz-Orejas, (1995b) A mutation that decreases the efficiency of plasmid R1 replication leads to the activation of parD, a killer stability system of the plasmid. *FEMS Microbiol Lett* **130**: 129-135.
- Ryden, S. M. y L. A. Isaksson, (1984) A temperature-sensitive mutant of Escherichia coli that shows enhanced misreading of UAG/A and increased efficiency for some tRNA nonsense suppressors. *Mol Gen Genet* **193**: 38-45.
- Saavedra De Bast, M., N. Mine y L. Van Melderen, (2008) Chromosomal toxin-antitoxin systems may act as anti-addiction modules. *J Bacteriol.*
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis, (1989) Molecular cloning. *Cold spring Harbour Laboratory Press, New York.*
- Sambrook, J. y R. Pollack, (1974) Basic methodology for cell culture--cell transformation. *Methods in enzymology* **32**: 583-592.
- Santos-Sierra, S., R. Giraldo y R. Diaz-Orejas, (1997) Functional interactions between homologous conditional killer systems of plasmid and chromosomal origin. *FEMS Microbiol Lett* **152**: 51-56.
- Santos-Sierra, S., R. Giraldo y R. Diaz-Orejas, (1998) Functional interactions between chpB and parD, two homologous conditional killer systems found in the Escherichia coli chromosome and in plasmid R1. *FEMS Microbiol Lett* **168**: 51-58.
- Santos-Sierra, S., M. Lemonnier, B. Nunez, D. Hargreaves, J. Rafferty, R. Giraldo, J. M. Andreu y R. Diaz-Orejas, (2003) Non-cytotoxic variants of the Kid protein that retain their auto-regulatory activity. *Plasmid* **50**: 120-130.
- Sat, B., R. Hazan, T. Fisher, H. Khaner, G. Glaser y H. Engelberg-Kulka, (2001) Programmed cell death in Escherichia coli: some antibiotics can trigger mazEF lethality. *J Bacteriol* **183**: 2041-2045.
- Sat, B., M. Reches y H. Engelberg-Kulka, (2003) The Escherichia coli mazEF suicide module mediates thymineless death. *J Bacteriol* **185**: 1803-1807.
- Scolnick, E., R. Tompkins, T. Caskey y M. Nirenberg, (1968) Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**: 768-774.
- Schaeffer, D., B. Tsanova, A. Barbas, F. P. Reis, E. G. Dastidar, M. Sanchez-Rotunno, C. M. Arraiano y A. van Hoof, (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 56-62.
- Scherrer, R. y H. S. Moyed, (1988) Conditional impairment of cell division and altered lethality in hipA mutants of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **170**: 3321-3326.
- Schmid, F., (1997) *Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes*. Oxford University Press, Oxford, UK.

- Schmidt, O., V. J. Schuenemann, N. J. Hand, T. J. Silhavy, J. Martin, A. N. Lupas y S. Djuranovic, (2007) prlF and yhaV encode a new toxin-antitoxin system in Escherichia coli. *J Mol Biol* **372**: 894-905.
- Schumacher, M. A., (2008) Structural biology of plasmid partition: uncovering the molecular mechanisms of DNA segregation. *The Biochemical journal* **412**: 1-18.
- Schumacher, M. A., K. M. Piro, W. Xu, S. Hansen, K. Lewis y R. G. Brennan, (2009) Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science* **323**: 396-401.
- Sevin, E. W. y F. Barloy-Hubler, (2007) RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biol* **8**: R155.
- Sharma, D., A. R. Cukras, E. J. Rogers, D. R. Southworth y R. Green, (2007) Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome. *J Mol Biol* **374**: 1065-1076.
- Sharon, M. y C. V. Robinson, (2007) The role of mass spectrometry in structure elucidation of dynamic protein complexes. *Annu Rev Biochem* **76**: 167-193.
- Smith, J. A. y R. D. Magnuson, (2004) Modular organization of the Phd repressor/antitoxin protein. *J Bacteriol* **186**: 2692-2698.
- Stark, H., M. V. Rodnina, J. Rinke-Appel, R. Brimacombe, W. Wintermeyer y M. van Heel, (1997) Visualization of elongation factor Tu on the Escherichia coli ribosome. *Nature* **389**: 403-406.
- Steyaert, J., (1997) A decade of protein engineering on ribonuclease T1--atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. *European journal of biochemistry / FEBS* **247**: 1-11.
- Summers, D. K. y D. J. Sherratt, (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* **36**: 1097-1103.
- Suzuki, M., J. Zhang, M. Liu, N. A. Woychik y M. Inouye, (2005) Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase. *Mol Cell* **18**: 253-261.
- Takagi, H., Y. Kakuta, T. Okada, M. Yao, I. Tanaka y M. Kimura, (2005) Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE-RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 327-331.
- Thomas, C. M. y K. M. Nielsen, (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews* **3**: 711-721.
- Trobro, S. y J. Aqvist, (2007) A model for how ribosomal release factors induce peptidyl-tRNA cleavage in termination of protein synthesis. *Mol Cell* **27**: 758-766.
- Tsilibaris, V., G. Maenhaut-Michel, N. Mine y L. Van Melderen, (2007) What is the benefit to Escherichia coli of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *J Bacteriol* **189**: 6101-6108.



- Tsuchimoto, S., Y. Nishimura y E. Ohtsubo, (1992) The stable maintenance system pem of plasmid R100: degradation of PemI protein may allow PemK protein to inhibit cell growth. *J Bacteriol* **174**: 4205-4211.
- Tsuchimoto, S., H. Ohtsubo y E. Ohtsubo, (1988) Two genes, pemK and pemI, responsible for stable maintenance of resistance plasmid R100. *J Bacteriol* **170**: 1461-1466.
- van den Heuvel, R. H., S. Gato, C. Versluis, P. Gerbaux, C. Kleanthous y A. J. Heck, (2005) Real-time monitoring of enzymatic DNA hydrolysis by electrospray ionization mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* **33**: e96.
- van den Heuvel, R. H., E. van Duijn, H. Mazon, S. A. Synowsky, K. Lorenzen, C. Versluis, S. J. Brouns, D. Langridge, J. van der Oost, J. Hoyes y A. J. Heck, (2006) Improving the performance of a quadrupole time-of-flight instrument for macromolecular mass spectrometry. *Analytical chemistry* **78**: 7473-7483.
- Van Melderren, L., P. Bernard y M. Couturier, (1994) Lon-dependent proteolysis of CcdA is the key control for activation of CcdB in plasmid-free segregant bacteria. *Mol Microbiol* **11**: 1151-1157.
- Van Melderren, L. y M. Saavedra De Bast, (2009) Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS genetics* **5**: e1000437.
- Wilboux, M., N. Mine, A. M. Guerout, D. Mazel y L. Van Melderren, (2007) Functional interactions between coexisting toxin-antitoxin systems of the ccd family in Escherichia coli O157:H7. *J Bacteriol* **189**: 2712-2719.
- Williams, D. R. y C. M. Thomas, (1992) Active partitioning of bacterial plasmids. *Journal of general microbiology* **138**: 1-16.
- Williams, J. J. y P. J. Hergenrother, (2008) Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Current opinion in chemical biology* **12**: 389-399.
- Winther, K. S. y K. Gerdes, (2009) Ectopic production of VapCs from Enterobacteria inhibits translation and trans-activates YoeB mRNA interferase. *Mol Microbiol* **72**: 918-930.
- Wolfson, J. S., D. C. Hooper, G. L. McHugh, M. A. Bozza y M. N. Swartz, (1990) Mutants of Escherichia coli K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **34**: 1938-1943.
- Yamamoto, T. A., K. Gerdes y A. Tunnacliffe, (2002) Bacterial toxin RelE induces apoptosis in human cells. *FEBS Lett* **519**: 191-194.
- Yang, X. y K. Moffat, (1996) Insights into specificity of cleavage and mechanism of cell entry from the crystal structure of the highly specific Aspergillus ribotoxin, restrictocin. *Structure* **4**: 837-852.
- Youngman, E. M., S. L. He, L. J. Nikstad y R. Green, (2007) Stop codon recognition by release factors induces structural rearrangement of the ribosomal decoding center that is productive for peptide release. *Mol Cell* **28**: 533-543.

- Zavialov, A. V., R. H. Buckingham y M. Ehrenberg, (2001) A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3. *Cell* **107**: 115-124.
- Zavialov, A. V., L. Mora, R. H. Buckingham y M. Ehrenberg, (2002) Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3. *Mol Cell* **10**: 789-798.
- Zhang, J., Y. Zhang, L. Zhu, M. Suzuki y M. Inouye, (2004) Interference of mRNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK. *J Biol Chem* **279**: 20678-20684.
- Zhang, S., M. Ryden-Aulin, L. A. Kirsebom y L. A. Isaksson, (1994) Genetic implication for an interaction between release factor one and ribosomal protein L7/L12 in vivo. *J Mol Biol* **242**: 614-618.
- Zhang, Y. y M. Inouye, (2009) The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an Escherichia coli toxin. *J Biol Chem* **284**: 6627-6638.
- Zhang, Y., J. Zhang, K. P. Hoeflich, M. Ikura, G. Qing y M. Inouye, (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in Escherichia coli. *Mol Cell* **12**: 913-923.
- Zhu, L., S. Phadtare, H. Nariya, M. Ouyang, R. N. Husson y M. Inouye, (2008) The mRNA interferases, MazF-mt3 and MazF-mt7 from Mycobacterium tuberculosis target unique pentad sequences in single-stranded RNA. *Mol Microbiol* **69**: 559-569.





## **X. ANEXOS**



# Novel *Escherichia coli* RF1 mutants with decreased translation termination activity and increased sensitivity to the cytotoxic effect of the bacterial toxins Kid and RelE

Elizabeth Diago-Navarro,<sup>1</sup> Liliana Mora,<sup>2</sup>  
Richard H. Buckingham,<sup>2</sup> Ramón Díaz-Orejas<sup>1\*</sup> and  
Marc Lemonnier<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Microbiology, Centro de Investigaciones Biológicas CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain.

<sup>2</sup>IBPC, CNRS UPR 9073, 13 rue Pierre et Marie Curie, F-75005 Paris, France.

## Summary

Novel mutations in *prfA*, the gene for the polypeptide release factor RF1 of *Escherichia coli*, were isolated using a positive genetic screen based on the *parD* (*kis*, *kid*) toxin–antitoxin system. This original approach allowed the direct selection of mutants with altered translational termination efficiency at UAG codons. The isolated *prfA* mutants displayed a ~10-fold decrease in UAG termination efficiency with no significant changes in RF1 stability *in vivo*. All three mutations, G121S, G301S and R303H, were situated close to the nonsense codon recognition site in RF1:ribosome complexes. The *prfA* mutants displayed increased sensitivity to the RelE toxin encoded by the *relBE* system of *E. coli*, thus providing *in vivo* support for the functional interaction between RF1 and RelE. The *prfA* mutants also showed increased sensitivity to the Kid toxin. Since this toxin can cleave RNA in a ribosome-independent manner, this result was not anticipated and provided first evidence for the involvement of RF1 in the pathway of Kid toxicity. The sensitivity of the *prfA* mutants to RelE and Kid was restored to normal levels upon overproduction of the wild-type RF1 protein. We discuss these results and their utility for the design of novel antibacterial strategies in the light

of the recently reported structure of ribosome-bound RF1.

## Introduction

Translation termination is an important stage in protein synthesis which leads to the release of the newly synthesized polypeptide chain from the ribosome. This is initiated when a termination codon in mRNA enters the ribosomal A site and is recognized by a class 1 release factor (RF). In bacteria, translation termination requires the active contribution of two protein release factors, RF1 and RF2 (Scolnick *et al.*, 1968); these factors recognize, respectively, and with different affinity UAA/UAG or UAA/UGA termination codons at the decoding centre of the ribosomal A site. A conserved tripeptide motif GGQ in RF1 or RF2 interacts with the peptidyl transfer centre (PTC) (Frolova *et al.*, 1999) and activates the hydrolysis of the ester bond between the polypeptide chain and the tRNA at the PTC, thereby releasing the newly synthesized polypeptide chain.

Specific recognition of termination codons by RF1 and RF2 involves specific tripeptide motifs, PxT for RF1 or SPF for RF2 (Ito *et al.*, 2000), which are present in a central domain of the proteins. The tripeptide motifs were first suggested to be responsible for recognizing the last two nucleotides of the three stop codons (Ito *et al.*, 2000), but recent structural studies indicate that they interact with the first two nucleotides (Laurberg *et al.*, 2008) and explain in part the remarkable accuracy with which the first stop codon nucleotide, an invariant uridine, is recognized (Freistroffer *et al.*, 2000). Discrimination against purines in the first stop codon position implicates residues near the tip of a helical finger ( $\alpha$ -helix 5) present in the central domain (Laurberg *et al.*, 2008). Two residues near the PxT motif, Q185 and T198 in *Escherichia coli* RF1, discriminate against pyrimidines in the third stop codon position (Laurberg *et al.*, 2008). Interactions of RF1 or RF2 with a third factor, RF3-GTP or GDP, at the GTP-associated centre of the 50S ribosomal subunit, are also required for the final detachment of the class 1 RFs from the ribosome (Freistroffer *et al.*, 1997; Zavialov *et al.*, 2001; 2002; Gao *et al.*, 2007).

Accepted 17 October, 2008. \*For correspondence. E-mail ramondiaz@cib.csic.es; Tel. +34 918373112; Fax +34 915352194.

†Present address: ANTABIO, Incubateur Midi-Pyrénées, 29 Rue Jeanne Marvig, 31400, Toulouse, France.

Re-use of this article is permitted in accordance with the Creative Commons Deed, Attribution 2.5, which does not permit commercial exploitation.

A more detailed understanding of the role of the GGQ motif conserved in class I RFs has been provided by crystal structures of RF1 and RF2 in complex with the ribosome (Petry *et al.*, 2005; Laurberg *et al.*, 2008), and by molecular dynamics simulations of peptide release (Trobro and Aqvist, 2007). The GGQ motif, together with A76 of the P-site tRNA, is instrumental in co-ordinating the water molecule that initiates a nucleophilic attack on the peptidyl-tRNA ester bond. Following the detachment of the RF from the ribosome the subsequent action of the ribosomal releasing factor RRF and the elongation factor EF-G (Karimi *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2007) leads to the de-assembling of the ribosomal subunits, which can then be recycled and reassembled in a new translation initiation event.

Pausing of a bacterial ribosome due to limitations in tRNA can lead to cleavage of mRNA at a site within or immediately adjacent to the A-site codon; the ribosome participates in this cleavage in an, as yet, undefined way (Hayes and Sauer, 2003; Sunohara *et al.*, 2004). Breaks at UAG and UGA stop codons induced by ribosome stalling due to the reduced activity of RF1 have been reported (Li *et al.*, 2007). Breaks in the mRNA at UAG termination codons at the A site can also be induced by the RelE toxin encoded by the bacterial toxin-antitoxin (TA) system *relBE*. The cleavage occurs preferentially between the second and third nucleotides of UAG termination codons in the ribosomal A site implying the concerted action of the RelE toxin and the ribosome (Pedersen *et al.*, 2003). The RelE toxin is activated under amino acid or carbon source limitation by a mechanism which involves the enhanced decay of the RelB antitoxin protein (Gerdes *et al.*, 2005). Consistent with this, RF1, which preferentially recognizes this termination codon at the A site, can protect against the RelE cleavage *in vitro* (Pedersen *et al.*, 2003). Cleavage of mRNA in all the above cases leads to the stalling of the ribosome at the end of the non-stop mRNA, and can eventually inhibit protein synthesis as in the case with RelE. Stalled ribosomes are released by the intervention of transfer-messenger RNA (tmRNA), which provides a new stop codon and tags potentially harmful truncated peptides for rapid degradation (Moore and Sauer, 2007); this, in turn, feeds amino acid pools [see Discussions by Gerdes *et al.* (2005) and by Condon (2006)].

The *kis-kid* antitoxin-toxin system of plasmid R1 codes for an unstable antitoxin Kis and a stable toxin Kid. Kid, like RelE, is also a specific endoribonuclease and an inhibitor of translation, but unlike RelE, Kid can cleave RNA in the absence of ribosomes and does so at the core sequence UA(A/C) preferentially but not exclusively in single-stranded regions (Zhang *et al.*, 2004; Munoz-Gomez *et al.*, 2005). Cleavage occurs by a mechanism similar to the RNase A and RNase T1, involving the Uracyl 2'-OH group and producing two fragments, with a 2':3'-

cyclic phosphate group at the uracyl and a free 5'-OH group at the adenosine respectively. Cleavage of RNA in the absence of ribosomes can also introduce non-stop mRNA in the translation machinery, a proposal that is consistent with the increased sensitivity to the Kid toxin observed in tmRNA-deficient strains (Munoz-Gomez, 2004).

While searching for *E. coli* mutations affecting the toxic activity of the Kid protein, we developed a genetic screen that was based on the selection of bacteria that could survive in the presence of a mutant *parD* locus encoding a functional Kid toxin and a truncated and inactive antitoxin resulting from an amber termination mutation in the *kis* antitoxin gene (Bravo *et al.*, 1988). As a consequence, the isolation of suppressors leading to the efficient bypass of the amber mutation in *kis* was one anticipated response. Unexpectedly, however, these mutations were found to be novel and to be exclusively targeted to the *prfA* gene encoding the RF1 protein. Our work reported here shows that these mutations reveal novel functional connections between the activity of bacterial toxins and translation termination factors.

## Results

### Isolation of novel *prfA* mutants in *E. coli*

Our work was initially focused on a search for *E. coli* mutants resistant to the cytotoxic activity of Kid. For this purpose, we used a double selection approach inspired by the work by Bernard and Couturier (1992), which led to the isolation of mutations in the *gyrA* gene encoding the A subunit of DNA gyrase, the bacterial target of the CcdB toxin. Two compatible plasmids were employed, pKK1120 and pAB1120, that confer resistance to tetracycline and kanamycin, respectively, and which both contain the mutant *parD* operon *kis74* (amber), *kid+* (Table 1). In the absence of suppression of the *kis74* mutation, an inactive form of the Kis antitoxin is produced, thus leading to a Kid-dependent inhibition of colony formation. In a first round of selection, *E. coli* cells treated with the mutagen 2-aminopurine were transformed with the pKK1120 plasmid and cultured in medium containing tetracycline. To enrich for potential Kid-resistant mutants, a second round of selection was carried out by transforming the cells with the pAB1120 plasmid and plating on medium supplemented with kanamycin. To discard possible mutations affecting either the *kid* gene itself or its regulatory elements present in the plasmid, the toxicity of the resident plasmids was assessed by extracting the plasmid DNA and retransforming fresh wild-type *E. coli* cells. Mutants that exhibited growth despite containing a toxic plasmid were kept for further characterization.

The mutations were mapped to the region between 22 and 32 min on the *E. coli* chromosome using a collection

**Table 1.** Plasmids used and constructed in this work.

Plasmid	Relevant features	Reference
pAB1120	R1, <i>copB</i> <sup>-</sup> , <i>parD</i> [ <i>kis74</i> , <i>kid(wt)</i> ], <i>kan</i>	Bravo <i>et al.</i>
pKK1120	pACYC184-derivative plasmid, <i>parD</i> [ <i>kis74</i> , <i>kid(wt)</i> ], <i>tet</i>	This work
pBAD18	pBR322-derivative expression vector, <i>amp</i>	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pELI01	pBAD18, <i>Para::prfA121</i> , <i>amp</i>	This work
pELI02	pBAD18, <i>Para::prfAwt</i> , <i>amp</i>	This work
pELI03	pBAD18, <i>Para::prfA301</i> , <i>amp</i>	This work
pELI04	pBAD18, <i>Para::prfA304</i> , <i>amp</i>	This work
pELI05	pFUS2, <i>Para::kis</i> , <i>kan</i>	This work
pELI06	pFUS2, <i>Para::kis74</i> , <i>kan</i>	This work
pELI07	pNDM220, <i>Plac::relE</i> , <i>amp</i>	This work
pELI08	pFUS2, <i>Para::prfAwt</i> , <i>kan</i>	This work
pELI09	pFUS2, <i>Para::relB</i> , <i>kan</i>	This work
pET80	<i>parD</i> [ <i>kis(wt)</i> , <i>kid(wt)</i> ], <i>kan</i>	Bravo <i>et al.</i> (1988)
pMLM1	mini-F, <i>repFIA</i> <sup>+</sup> , <i>sop</i> <sup>+</sup> , <i>cat</i>	Lemonnier <i>et al.</i> (2000)
pFUS2	pFUS-derivative expression vector, <i>kan</i>	Lemonnier <i>et al.</i> (2000)
pNDM220	miniR1-derivative expression vector, <i>amp</i>	Gotfredsen and Gerdes (1998)
pSS100	pNDM220, <i>Plac::kid</i> , <i>amp</i>	Santos_Sierra <i>et al.</i> (2002)

of different Hfr-Tn10 strains (data not shown). To refine the genetic mapping of the mutations, the mutant strains were used as recipients in P1 transduction experiments performed using different donor strains bearing Tn10 transposon insertions at regular intervals between minutes 22 and 32 on the chromosome. For one of the mutants we observed that the pAB1120-resistance phenotype was lost at high frequency upon transduction from a donor containing the Tn10 at position 26.61 min. In order to isolate the mutant gene, fragments of the chromosome of the mutant strain (hereafter the KR19 strain), generated by partial *Sau3A* restriction digestion, were cloned into a low-copy-number mini-F, pMLM1 (Lemonnier *et al.*, 2000). *E. coli* cells were transformed with this library, pooled and subsequently transformed with the pAB1120 plasmid. Mini-F plasmids carrying fragments that conferred resistance to pAB1120 were isolated and their chromosomal insert sequenced. All the sequenced fragments consisted in a chromosomal region enclosing the *prfA* gene encoding polypeptide release factor RF1. The localization of this gene at 27.2 min in the *E. coli* chromosome was consistent with the results of the Hfr mapping. Subsequently, the sequencing of the *prfA* region of KR19 and of several independent mutants isolated by this approach revealed that in all cases mutations in the *prfA* gene could be detected. Four independent mutants, hereafter called KR2, KR4, KR17 and KR19, were kept for subsequent studies. Sequencing analysis revealed that the mutations consisted of single-base G-C or A-T transitions, as expected from a 2-aminopurine mutagenic treatment (Ronen, 1980). Strains KR2 and KR19 were found to bear the same mutation, *prfA301*, which led to a Gly to Ser amino acid change at position 301 of RF1. Strain KR4 carried the mutation *prfA303*, in which an Arg has changed to Ser at position 303 of RF1. Finally, KR17

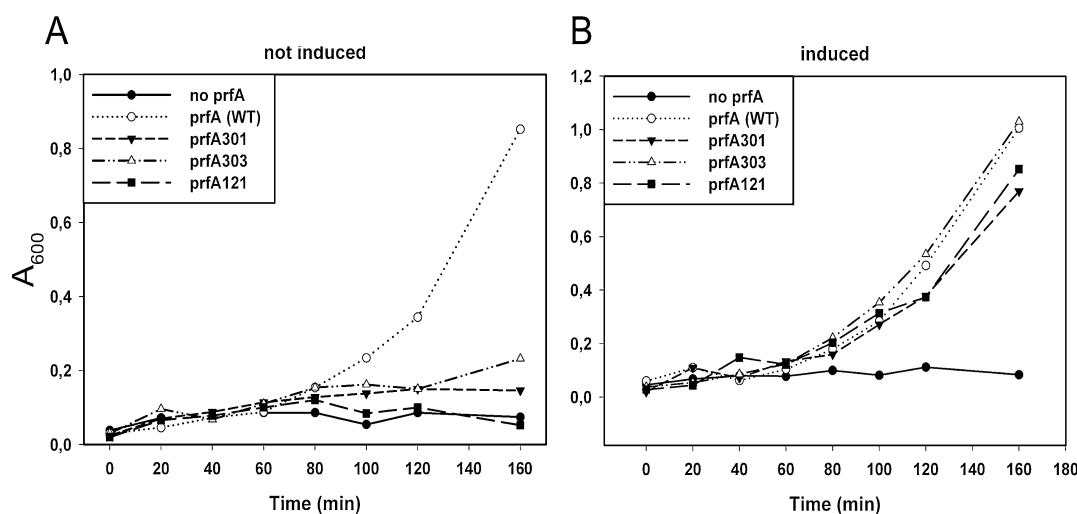
strain carried the mutation *prfA121*, a Gly to Ser change at position 121 of RF1.

#### *The prfA mutants are unable to complement a prfA(ts) mutation unless they are overexpressed*

To assess whether the isolated *prfA* mutants were affected in their translation termination activity *in vivo*, we performed a complementation assay using a conditional temperature-sensitive *E. coli* mutant, MRA8 *prfA1(ts)* (Ryden and Isaksson, 1984; Zhang *et al.*, 1994). The strain was transformed with the pBAD18 plasmid derivatives pELI01, pELI02, pELI03 and pELI04, which carried the alleles *prfA121*, *prfA wt*, *prfA301* and *prfA303*, respectively, under the control of the arabinose-inducible promoter pBAD (Guzman *et al.*, 1995). MRA8 was also transformed with pBAD18 as a control. At basal expression levels (i.e. in the absence of arabinose), wild-type *prfA* expressed from pELI02 was able to complement the *prfA1(ts)* mutation at the non-permissive temperature of 42°C, whereas none of the mutants was able to do so (Fig. 1, left). When expression of the *prfA* alleles was induced by adding arabinose to the medium, the growth of strain MRA8 at 42°C was significantly recovered for all the mutants tested (Fig. 1, right). Since overexpression of the mutant proteins was able to achieve complementation, these results indicated that the mutations significantly decreased, but did not abolish, the efficiency of translational termination by RF1.

#### *Decreased translation termination in vivo leads to readthrough of stop codons*

Since the mutations affected RF1, which specifically recognizes UAG (amber) stop codons, a likely explanation

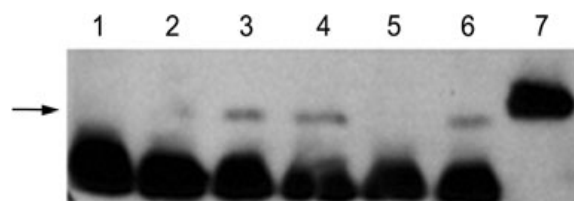


**Fig. 1.** Complementation of a temperature-sensitive *prfA* mutation. MRA8 [*prfA1(ts)*] strain was transformed with the plasmids pELI01 (*prfA121*), pELI02 (*prfAwt*), pELI03 (*prfA301*) and pELI04 (*prfA303*). Expression of the *prfA* alleles in these plasmids was placed under the control of a promoter whose activity could be induced by adding arabinose into the medium.

A. Uninduced cultures were grown at 42°C for up to 160 min.

B. Same experiment but arabinose (1% final) was present in the medium to induce the expression of the different *prfA* alleles.

for the phenotype of resistance displayed by the mutants was the readthrough of the *kis74* amber mutation, which would allow the production of an active, full-length antitoxin. Wild-type *E. coli* cells and KR19 mutant bacteria were transformed with either the plasmid vector pFUS2, or its derivatives pELI05 and pELI06 bearing the wild-type *kis* and the mutant *kis74* alleles, respectively, placed under the control of the arabinose-dependent pBAD promoter (Guzman *et al.*, 1995). Following overexpression of the *kis* alleles by addition of arabinose to the cultures, cell lysates were prepared and analysed by Western blot using anti-Kis antibodies (Fig. 2). A band corresponding to the full-length Kis protein was detected in the lysates obtained from wild-type and KR19 cells carrying the pELI05 (*kis+*) plasmid. This band was not present in lysates of wild-type cells containing pELI06, which produced a Kis protein of a lower size resulting from the



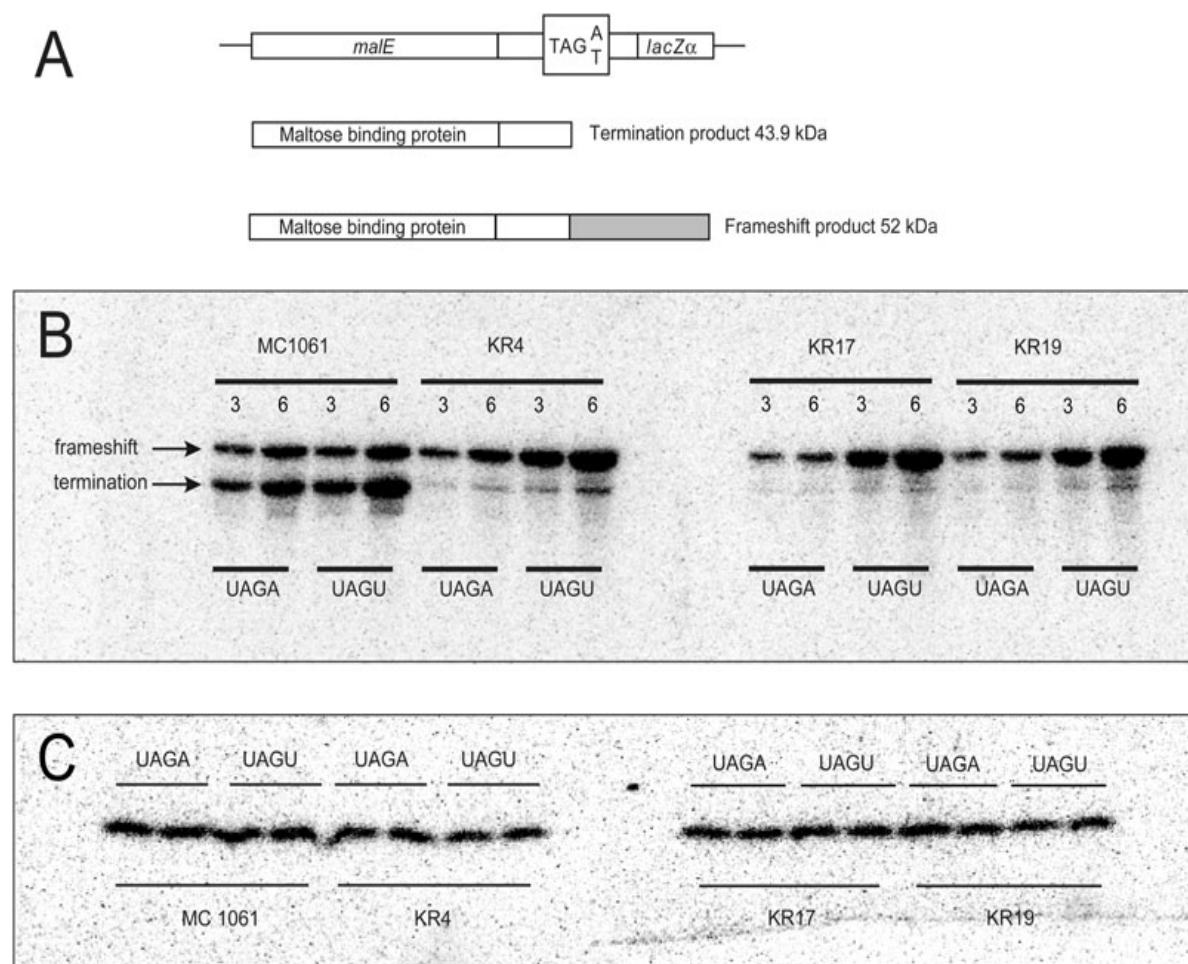
**Fig. 2.** *In vivo* readthrough of the *kis74* amber mutation in KR19 strain. Western blot analysis was performed using different cell extracts as described in *Experimental procedures*. The black arrow indicates full-length Kis protein. Lanes 1, 3 and 5, cell extracts from strain MC1061 bearing pFUS2, pELI05 (*kis*) and pELI06 (*kis74*) plasmids, respectively; lanes 2, 4 and 6, cell extracts from strain KR19 carrying pFUS2, pELI05 and pELI06 plasmids, respectively; lane 7, purified his-tagged Kis protein. The thick band at the bottom of the gel is a non-specific product present in whole-cell lysates.

truncation of the protein at site 74. Note that this Kis74 protein could not be well detected because it co-migrated with a lower non-specific band. In strain KR19 containing pELI06, readthrough of the stop codon at position 74 yielded a Kis protein of higher molecular weight, most likely a full-length protein, indicating a decreased *in vivo* efficiency of translation termination by the mutant RF1 protein at UAG stop codons. Similar results were also obtained for the KR17 mutant (data not shown).

#### *RF1 mutations strongly reduce the specific termination activity of RF1 at UAG codons*

Altogether, these results suggested that the *prfA* mutant strains KR4, KR17 and KR19 were deficient in translation termination activity at UAG codons. This hypothesis could be tested using a system described by Curran and Yarus (1989) and developed into a convenient and precise assay system by Poole *et al.* (1995). This system is based on competition between translational termination and ribosomal frameshifting at the frameshift site present in *E. coli prfB*. At this site, an in-frame UGA stop codon in the mRNA is bypassed by a +1 ribosomal frameshift, stimulated by the presence of a Shine–Dalgarno sequence six nucleotides upstream of the stop codon. In the assay system, the RF2 frameshift window is fused to the *malE* gene, expressed from a plasmid. Termination and +1 frameshifting lead to proteins of 43.9 and 52.0 kDa, respectively (Fig. 3A), that are separated by SDS gel electrophoresis and detected by Western blotting, binding of anti-MalE antibody and interaction with <sup>125</sup>I-labelled Protein A. The ratio of the termination product to the





**Fig. 3.** Efficiency and levels of RF1 in *prfA* mutant strains *in vivo*. Termination was measured by competition with frameshifting at the shifty site present in the *E. coli prfB* gene (Poole *et al.*, 1995).  
**A.** A region of 23 nucleotides from the *prfB* gene around the frameshift site was fused to the *malE* gene present in a plasmid under the control of the P-tac promoter. Frameshifting (+1) of the ribosome paused at the in-frame stop signal allows translation to continue into a sequence derived from the *lacZ* gene. The wild-type tetranucleotide stop signal TGAC was replaced by the tetranucleotides TAGA or TAGU.  
**B.** Expression of the MalE fusion products was induced *in vivo* in the parental strain MC1061 and each of the mutant strains KR4, KR17 and KR19 with IPTG for 2 h. The protein products of termination and frameshifting present in 3 or 6 μl of cell extract (see *Experimental procedures*) were separated on SDS gels and visualized by Western blotting using anti-MalE antibodies and <sup>125</sup>I-labelled protein A.  
**C.** The amounts of RF1 in parental and *prfA* mutant strains were determined by quantitative Western blotting with rabbit anti-RF1 antibodies and <sup>125</sup>I-labelled protein A.

frameshift product is a measure of relative termination efficiency at different stop signals or in different strains.

The activity of the *prfA* mutant strains was tested at UAG stop codons in two contexts: UAGA and UAGU, both

less favourable for termination than the most common UAG stop signal, UAGG. Western blots of this assay are shown in Fig. 3B, and the termination rate constants relative to frameshifting in Table 2. Expression of the fusion

**Table 2.** Termination rate at UAG codons and quantities of RF1 in *prfA* mutant strains.

	MC1061	KR4	KR17	KR19
RF1 mutation	–	R303H	G121S	G301S
Termination rate at UAGA	1.30	0.18	0.15	0.14
Termination rate at UAGU	1.42	0.16	0.06	0.12
Relative quantity of RF1	100	80	85	85

Data are obtained by quantification of Western blots such as those shown in Fig. 3. Termination rate at UAGA and UAGU stop signals is expressed relative to +1 frameshifting in a frameshift window derived from the RF2 frameshift site. The quantity of RF1 in mutant strains, measured by reaction with anti-RF1 antibodies, is expressed as a percentage of that found in the parental strain MC1061.

proteins in the *prfA* mutant strains somewhat inhibited cell growth, which accounts for the reduced amount of fusion protein in these strains; for reasons that are unclear the inhibitory effect was more pronounced with the UAGA-containing fusion. The values found for the termination rate in parental strain MC1061 are close to those reported by Poole *et al.* (1995) but lower than those of Mora *et al.* (2007) in other *E. coli* K12 strains. It should be recalled that strain MC1061 is a streptomycin-dependent strain, grown in the presence of streptomycin, and that this is likely to influence the kinetic parameters for translation and translation termination. As seen in Table 2 (rows 2 and 3), termination rates for all three mutants at both UAGA and UAGU signals were strongly reduced with respect to the wild type by an average factor of about 10.

Two mechanisms might explain this result: the mutations may affect the folding or stability of RF1, resulting in a strongly reduced amount of RF1 in the cell. Alternatively, the activity of the protein may be reduced compared with that of the normal factor. To resolve this question, the amount of RF1 present in the *prfA* mutant strains was compared with the parental strain by quantitative Western blotting using anti-RF1 antibodies. The results (Fig. 3C, Table 2, row 4) showed that the reduction in the amount of RF1 in the mutant strains was quite modest (15–20%), insufficient to explain the 10-fold drop in termination rate in the cells; the major part in this drop must therefore be due to reduced activity of the mutant factors.

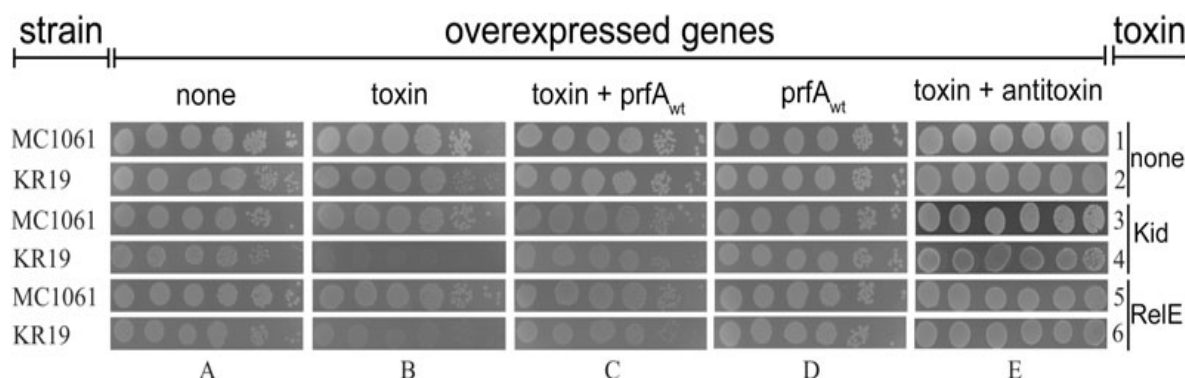
The small decrease in the amount of RF1 found in the mutant strains suggested that the mutant factors were not strikingly less stable than the wild-type factor. This conclusion might however be invalid if an autocontrol mechanism were present in cells, with the consequence that a lowered peptide release activity were to lead to a higher rate of synthesis of the RF. Such an autocontrol mechanism does exist in the case of RF2 in *E. coli* and in about 70% of microorganisms for which genome sequences are known (Baranov *et al.*, 2002), based on the competition between termination and frameshifting that we have used to assay termination efficiency. The *prfA* gene is expressed from the promoter of the upstream gene, *hemA*. It has been suggested that *E. coli* and *Salmonella* may possess a mechanism for the autocontrol of RF1 synthesis, dependent upon readthrough of the weak UAGC tetranucleotide stop signal of the *hemA* gene, coupled with a suboptimal ribosome binding site for *prfA* expression (Elliott, 1989). The hypothesis suggests that RF1 synthesis may result to a significant extent from ribosomes that read through the *hemA* stop signal, translate the intergenic region, terminate just short of the *prfA* initiation codon and resume translation without dissociating from mRNA. To test this hypothesis, we constructed translational fusions with *lacZ* extending from the promoter region of *hemA* to codon 13 of *prfA*, analogous to

those described by Dahlgren and Ryden-Aulin (2004), and studied the effect on  $\beta$ -galactosidase synthesis of mutating the *hemA* stop signal or introducing mutations in RF1. The results showed that even in the case of the RF1 mutants described in this article, little RF1 is in fact synthesized in *E. coli* by the proposed readthrough mechanism (L. Mora, unpubl. data). These results further confirm that the detected levels of the RF1 mutants reflect a minor effect on stability and therefore that the isolated mutations do not affect substantially the stability of RF1.

#### *prfA* mutation leads to hypersensitivity to Kid and RelE toxins

Since RF1 was shown to protect from RNA cleavage by the RelE toxin *in vitro* (Pedersen *et al.*, 2003), we hypothesized that the mutant RF1 strains should be particularly responsive to the activity of RelE *in vivo*. For this analysis we selected the *prfA* mutant KR19 as this mutant showed the lowest overall termination efficiency in the assays (see Table 2). We produced the RelE protein in this mutated *prfA* strain and compared the levels of cytotoxicity with those achieved in a wild-type *E. coli* background. To gain insight into the mechanism of RF1-dependent protection, we performed a parallel control experiment in which the Kid toxin was produced in place of RelE. Figure 4 shows the cytotoxic effects of both Kid and RelE proteins over the wild type, MC1061, and the mutant strain KR19 bearing the plasmids pNDM220 (vector), pELI06 (*kid*) or pELI07 (*relE*). Figure 4A and D shows that the growth of the strains in the absence of induction of the toxins is unaffected. The partial induction of toxins Kid or RelE with a less-than-saturating concentration of IPTG (100  $\mu$ M) inhibited cell growth in *prfA* mutant strains but not in the wild-type strain MC1061 (Fig. 4B, rows 4 and 6 compared with rows 3 and 5). This suggested that KR19 was hypersensitive to both toxins. When this strain was transformed with pELI08 (*prfA*wt), normal sensitivity to toxins was restored (Fig. 4C, rows 3–6), suggesting a specific effect of the mutations in *prfA* on the hypersensitivity to the toxins. The growth inhibition of the *prfA* mutants by the Kid and RelE toxins was neutralized when their respective antitoxin genes *kis* and *relB* were coexpressed (Fig. 4E, rows 3–6). Altogether these experiments brought to light a novel and specific functional interplay between RF1 and the Kid and RelE toxins.

Both RelE and Kid toxins are inhibitors of protein synthesis. We therefore evaluated the effect of these toxins on the *de novo* protein synthesis in the *prfA* mutant and wild-type strains at the suboptimal induction conditions mentioned above. The results (Fig. 5) indicated that indeed the RelE and Kid toxins inhibited protein synthesis in the *prfA* mutant but not in the wild-type strain. The enhanced inhibition of protein synthesis by Kid and RelE was prevented when their cognate Kis and RelB antitox-

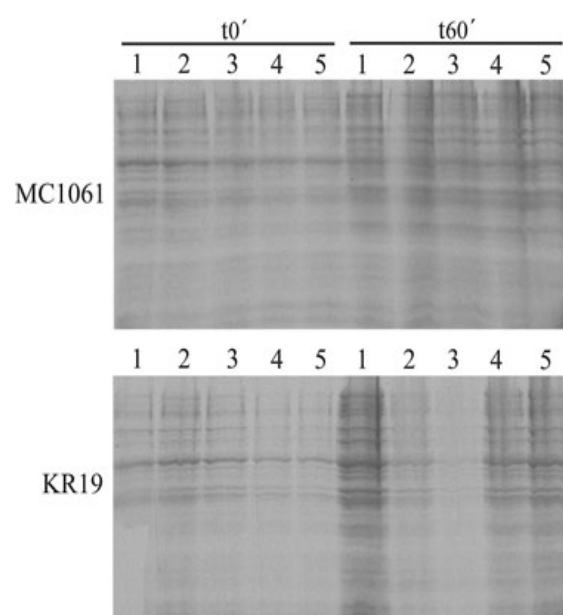


**Fig. 4.** Hypersensitivity of the *prfA* mutant strain KR19 to the Kid and RelE toxins and neutralization by cognate antitoxins and by *prfA*<sub>wt</sub> overexpression. Parental MC1061 and *prfA* mutant KR19 strains bearing the pNDM220 plasmid vector (lanes 1 and 2) or its derivatives encoding Kid (lanes 3 and 4) and RelE (lanes 5 and 6) toxins were grown exponentially to an  $A_{600}$  of 0.4 in LB medium. Serial dilutions ( $10^{-1}$  steps from left to right) of the different cultures were spotted in LB solidified medium. In (B) and (C), IPTG (100  $\mu$ M) was included in the plates to induce the expression of the Kid and RelE toxins from the plasmids. In (A) and (D), the same experiment was performed but IPTG was omitted. Specificity controls were carried out by transforming the cells with plasmid pELI08 (*prfA*<sub>wt</sub>) (C and D) or with the plasmids encoding the respective antitoxins to Kid and RelE, namely plasmids pELI05 (*kis*) and pELI09 (*relB*) (E). The plates were incubated at 30°C and photographs were taken after 18 h incubation.

ins were expressed in the cells, respectively (Fig. 5), indicating as in the previous assay that the inhibitory effect on protein synthesis is specific to the activity of the toxins. Protection by the RF1<sub>wt</sub> protein in this assay was less efficient, which is likely a reflection of the more specific interaction of a toxin with its cognate antitoxin (data not shown). Altogether, the increased efficiency in protein synthesis inhibition was consistent with the enhanced cytotoxic effect displayed by the Kid and RelE proteins in the mutant *prfA* background.

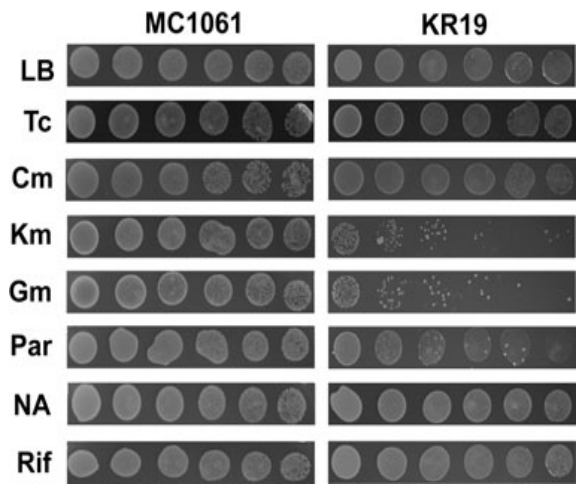
To test whether the extra-sensitivity to the toxins of the *prfA* mutants was an indirect consequence of a general stress on the translation apparatus we first compared the sensitivity of the wild type and mutant strain to antibiotics acting on translation, such as chloramphenicol or tetracycline, inhibitors of the peptidyl transferase activity or of aminoacyl tRNA binding respectively (Chopra and Roberts, 2001; Hansen *et al.*, 2003). The sensitivity to different aminoglycosides (kanamycin, gentamicin and paromomycin) was also tested. These family of antibiotics interact at the A site on the 30S subunit of the ribosome affecting codon–anticodon recognition and translocation of tRNA between the A and P sites (Kotra *et al.*, 2000). We obtained the following results (see Fig. 6): (i) there were no differences in the sensitivity of the wild-type and *prfA* strains to chloramphenicol and tetracycline, thus ruling out increased sensitivity to Kid and RelE as a circumstantial consequence of a general stress on the translation apparatus imposed by the *prfA* mutations, and (ii) the mutant strain was more sensitive than the parental one to kanamycin, and to the other aminoglycosides tested. This is somehow an expected result as these antibiotics interact with a region that is overlapping with the domain of interaction of RF1 (see *Discussion*).

As an additional control to test possible unspecific effects of the *prfA* mutation on other cellular processes, we used Nalidixic acid (an inhibitor of DNA Gyrase and an inducer of the SOS response) or Rifampycin (an inhibitor of RNA polymerase and therefore of transcription). No



**Fig. 5.** Inhibition of protein synthesis *in vivo* by the Kid and RelE toxins. Strains MC1061 (top) or KR19 (bottom) were transformed with plasmids as indicated: lane (1) plasmid vector pNDM220, lane (2) pSS100 (*kid*), lane (3) pELI07 (*relE*), lane (4) pSS100 (*kid*) and pELI05 (*kis*), lane (5) pELI07 (*relE*) and pELI09 (*relB*). When relevant, expression of the toxin and antitoxin genes was triggered by adding IPTG (100  $\mu$ M) and arabinose (0.5%) to the medium respectively. The proteins synthesized at time 0 or 60 min after the induction of the toxin and antitoxin genes were fractionated by SDS-PAGE (12.5%) and identified by autoradiography as described in *Experimental procedures*.



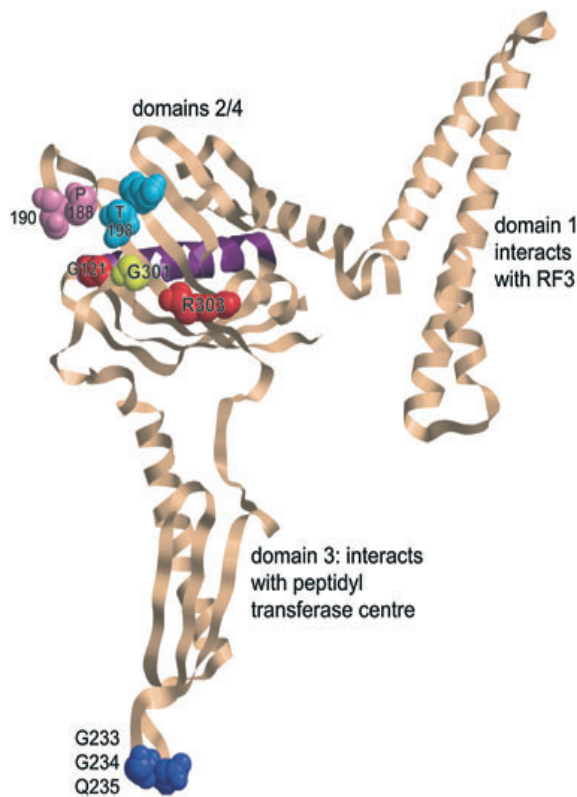


**Fig. 6.** Sensitivity assays of the KR19 (*prfA*301) and the parental strain MC1061 to different antibiotics. Parental MC1061 and *prfA* mutant KR19 strains were grown at 30°C to an *A*<sub>600</sub> of 0.4 in LB medium. Serial dilutions (10<sup>-1</sup> steps from left to right) of the different cultures were spotted in LB solidified medium (lane LB) as a positive control or in the same medium supplemented with the different antibiotics: tetracycline (Tc, 0.1 µg ml<sup>-1</sup>), chloramphenicol (Cm, 0.5 µg ml<sup>-1</sup>), kanamycin (Km, 1.0 µg ml<sup>-1</sup>), gentamicin (Gm, 0.5 µg ml<sup>-1</sup>), paromomycin (Par, 1.0 µg ml<sup>-1</sup>), nalidixic acid (NA, 1.0 µg ml<sup>-1</sup>) and rifampycin (Rif, 1.0 µg ml<sup>-1</sup>). Concentrations of the different antibiotics close to their minimal inhibitory concentrations were used. The plates were incubated at 30°C and photographs were taken after 18 h incubation.

differences between wild type and *prfA* mutants to the sensitivity to these inhibitors were found (Fig. 6). This further supports the specificity of the increased sensitivity to the RelE and Kid toxin observed in the mutants.

Discussion

In this article we report the isolation and characterization of novel mutations in *prfA* affecting the translation termination factor RF1. As previously described these mutations were selected by means of a novel TA system-based genetic screen leading to the efficient counter-selection of cells with intact translation termination capacities. The three mutant residues isolated in RF1 are grouped quite closely together and are nearby the region of RF1 known to be involved in stop codon recognition (Fig. 7). This includes a tripeptide motif (PxT, 188–190 in RF1, SPF, 205–207 in RF2) (Ito *et al.*, 2000) important in the recognition of the first and second stop codon nucleotides (Laurberg *et al.*, 2008) and amino acid residues at the tip of helix α5 (shown in blue in Fig. 7) in RF1 and RF2, which help discriminate against purines at the constant first position U of stop codons (Petry *et al.*, 2005; Laurberg *et al.*, 2008). One of the mutations, G121, is present at the tip of this helix, and is within about 6 Å of the first two nucleotides, U4 and A5 of the mRNA stop codon (Fig. 8, Table 3). Mutation R303 is close to A1492 and A1493 in 16S rRNA, involved both in



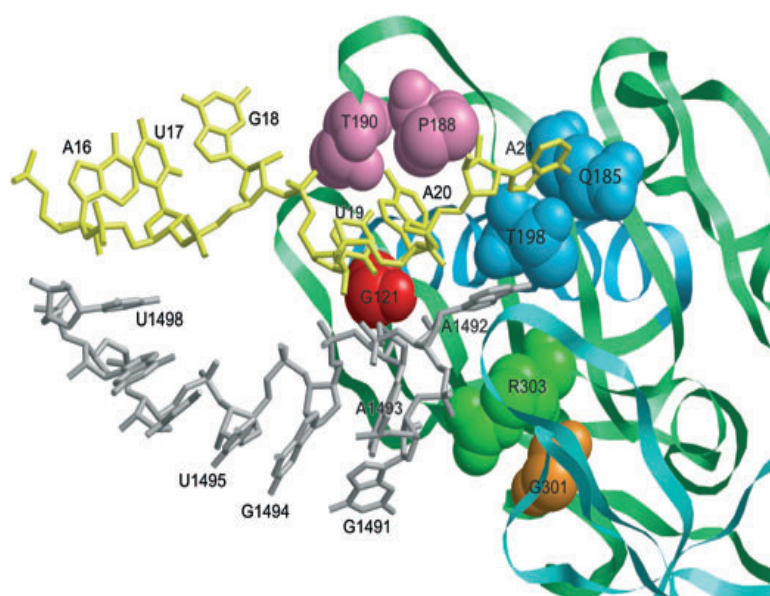
**Fig. 7.** Positions of the mutations in RF1 in relation to domains and sequence motifs of functional importance. The positions of residues G121, G301 and G303 for which mutants are found are shown space-filled in red (G121 and R203) or yellow (G301) on a model of the open form of *Thermotoga maritima* RF1 in ribbon representation (Vestergaard *et al.*, 2005). The α5 helix, which has G121 at the tip, is shown in violet. The PxT motif implicated in recognition of the stop codon (Ito *et al.*, 2000) is shown space-filled in pink, and residues T198 and Q185 interacting with the third stop codon nucleotide (Laurberg *et al.*, 2008) are space-filled in light blue. The GGQ motif that interacts with the peptidyl transferase centre and triggers peptidyl-tRNA hydrolysis is shown space-filled in blue.

recognition of sense codons in the A site by tRNA (Ogle *et al.*, 2001; Ogle and Ramakrishnan, 2005) and in translation termination (Laurberg *et al.*, 2008), as well as to other adjacent nucleotides. Both R303 and G301 are close to ribosomal protein S12 (Fig. 8, Table 3). Mutations in S12 are known to affect the accuracy of stop codon recognition. Thus all three mutations are situated close to the stop codon recognition site, which is consistent with their effect

**Table 3.** Components of mRNA, 16S rRNA and proteins of the 30S ribosomal subunit within about 6 Å of the mutant residues in RF1.

Mutant residue	mRNA	16S rRNA	30S proteins
G121	U4, A5	A1493, G1494	
G301			S12: T43
R303		A1491, A1492	S12: T43, P44

The nearby components were identified using the structure file of the RF1:70S ribosomal complex (Laurberg *et al.*, 2008). See also Fig. 8.



**Fig. 8.** Ribosomal and mRNA components near to mutant residues in RF1. Components near residues G121, G301 and R303 in *E. coli* RF1 are shown, based on the 3.2 Å resolution crystal structure of Laurberg *et al.* (2008) of *Thermus thermophilus* RF1 bound to homologous 70S ribosomes in the presence of a short mRNA (5'-GGC AAG GAG GUA AAA A<sub>16</sub>U<sub>17</sub>G<sub>18</sub> U<sub>19</sub>A<sub>20</sub>A<sub>21</sub> AAA AAA-3'; stop codon in bold; nucleotides 16–21 are shown in yellow) and P- and E-site bound tRNA<sup>Met</sup>. The RF1 polypeptide is shown as a green ribbon (except for helix α5, in blue), with mutant residues space-filled (G121: red, G301: orange, R303: green); residues are numbered as in *E. coli* RF1. Residues in RF1 involved in stop codon recognition are also shown space-filled (P188 and T190: rose, Q185 and T198: blue). Nucleotides 1491–1498 in 16S rRNA are shown in grey, and ribosomal protein S12 is shown as a turquoise ribbon. See Table 3 for more information about near neighbours of the mutant residues in RF1.

on the efficiency of translation termination mediated by RF1. It would be of interest to study their effect on the accuracy of stop codon recognition.

These novel *prfA* mutants show increased sensitivity to the RelE and Kid toxins. This phenomenon, detected both in growth and in protein synthesis assays, and the suppression of this sensitivity by the overproduction of *prfAwt* *in vivo* revealed an unexpected confluence in the pathway of action of these two toxins. Previous reports showed that the RelE toxin acts as an endoribonuclease in concerted action with the ribosome to cleave at the UAG termination codon at the A site of the ribosome, thus leading to translation inhibition. Consistent with this it was found that RF1 prevents RNA cleavage by this toxin (Pedersen *et al.*, 2003). RelE seems to have a shape similar to the C-terminal region of translation elongation factor EF-G (Takagi *et al.*, 2005), which could explain its access to the UAG codon in the A site of the ribosome. The protection conferred by RF1 against the action of RelE likely reflects a competition for the same substrate. The mutations could affect this competition ultimately favouring the action of the toxin. A similar explanation could account for the extra-sensitivity of the *prfA* mutant to paromomycin and other aminoglycosides, which interact with the 30S subunit of the ribosome at a region overlapping with the site of interaction of RF1. Paromomycin binding to 30S ribosomes directly displaces A1492 and A1493 from 16S rRNA helix 44 to a bulged-out state characteristic of ribosomes containing cognate tRNA in the A site (Ogle *et al.*, 2001). The modes of binding of kanamycin and gentamicin to the ribosome are similar (Francois *et al.*, 2005). The extrahelical position of A1493 sterically impedes RF1 binding (Laurberg *et al.*, 2008), explaining the competitive inhibition of termination by paromomycin (Youngman

*et al.*, 2007). These aminoglycosides therefore introduce perturbations into the same region of the decoding site as the RF1 mutations we describe here, suggesting that the increased sensitivity of the mutant strains to the antibiotics is due to an accumulation of factors interfering with stop codon recognition by RFs.

Unlike RelE, the Kid and ChpAK (MazF) toxins are able to cleave RNA in the absence of ribosomes (Zhang *et al.*, 2003; 2004; Munoz-Gomez *et al.*, 2004; 2005) following a mechanism similar to the one described for RNase A and RNase T1 (Christensen *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2003; Kamphuis *et al.*, 2006). Since the structure of the Kid protein is clearly different from that of RelE, similarities in their mechanisms to access the A site of the ribosome seem unlikely. It is noteworthy however that the Kid toxin can cleave the minimal substrate UpA which is part of the termination codon UAG/A (Kamphuis *et al.*, 2006). It remains to be seen if the hypersensitivity to Kid observed in the *prfA* mutants could be due to interactions between Kid and RF1, which remain to be elucidated. Alternatively, in view of the fact that reduced activity of the RF1 can induce ribosome stalling at the stop codon and subsequent mRNA cleavage (Li *et al.*, 2007), the increased toxicity of the *prfA* mutants to the Kid toxin could also be due to an enhancement of this stalling. Whatever the mechanism, it seems clear that the increased sensitivity of the *prfA* mutants to aminoglycosides and to the Kid and RelE toxins is a specific effect of these mutations rather than the unspecific consequence of a general stress on translation induced by them. This result provided the first evidence for the involvement of RF1 in the pathway of Kid toxicity.

The new *prfA* mutants contributed to showing that a post-transcriptional mechanism is not involved in maintain-

**Table 4.** Strains used in this work.

Strain	Genotype	Reference
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> $\lambda$ DE3	Novagen
MC1061	F <sup>-</sup> <i>araD139 galE15 galK16 rpsL hsdR2</i> (rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ) <i>mcrA mcrB1</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center
KR19 (KR2)	MC1061 <i>prfA301</i>	This work
KR4	MC1061 <i>prfA303</i>	This work
KR17	MC1061 <i>prfA121</i>	This work
MRA8	<i>prfA1(ts)</i>	Zhang <i>et al.</i> (1994)
W3110	F <sup>-</sup> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>rph-1 INV(rrmD, rrmE)</i>	Bachmann (1972)

ing the levels of the RF1 in the cells. The mutants could be used to further explore the contribution of new residues close to the RF decoding region in the recognition of the termination codons and/or in the transmission of the signal that activates the transpeptidase of RF1 at the PTC distal site. In addition, the experiments reported provide the first *in vivo* evidence for a functional interaction between the RelE toxin and the RF1 protein. Furthermore, evidence is provided for a role of translation termination factors in the cytotoxicity pathway of the Kid toxin. The results in turn reveal an unexpected functional confluence between two distinct families of bacterial toxins, namely the RelE and Kid families. Similarities and differences in these pathways remain to be fully established. The hypersensitivity of the *prfA* mutants to the RelE and Kid toxins also opens the possibility of exploring their effects on other toxins belonging to the *kis-kid/ccd* and the *relBE/parDE* superfamilies (Gerdes *et al.*, 2005). These include toxins targeting DNA gyrase such as CcdB and ParE in addition to toxins which acts on RNA as Kid and RelE. In theory it can be anticipated that the *prfA* mutants should also be extra-sensitive to the RNase-type toxins of the family but not to the toxins targeting the DNA Gyrase. Finally, the results and methods reported here provide a rationale for the design of screening approaches to isolate inhibitors of RF1 activity. Such compounds would likely potentiate the antibacterial activity of TA systems. Most interestingly, some antibiotics have been reported to specifically activate TA systems (Sat *et al.*, 2001). In this respect as well, compound drugs inhibiting RF1 activity would be particularly appealing as they would provide a back-up induction of TA toxicity in antibiotic-resistant strains. Novel therapeutic alternatives against drug-resistant pathogens are urgently needed and the work reported here certainly opens new avenues towards that goal.

## Experimental procedures

### Bacteria strains

*Escherichia coli* K-12 strains used in this work are described in Table 4.

### Genetic screen

*Escherichia coli* K-12 bacteria (strain MC1061) were subjected to mutagenesis following treatment with 2-aminopurine as described by Miller (1972). The treated bacteria were made electrocompetent and were electroporated with plasmid pKK1120 using a Bio-Rad MicroPulser™ and following the manufacturer's instructions. The cells were allowed to recover by shaking in SOC (Hanahan, 1983) medium for 1 h at 37°C. After a brief centrifugation, the cells were re-suspended in LB medium (Miller, 1972) containing tetracycline (10 µg ml<sup>-1</sup>) and incubated at 37°C with aeration for 14 h. After two washes in saline, the cells were rendered electrocompetent as described above and were electroporated with plasmid pAB1120. The cells were recovered in SOC medium and were spread on LB agar plates containing kanamycin (50 µg ml<sup>-1</sup>) and streptomycin (200 µg ml<sup>-1</sup>). The plates were incubated at 37°C for more than 18 h.

### Plasmid construction

Plasmids used and constructed in this work are listed in Table 1. To construct the pBAD18-derivative plasmids (Table 1), PCR fragments were generated using primers PRL (+) (5'-GACAGCTAGCGGCTGGAGTA-3'; NheI site underlined) and PRR (-) (5'-GGTAGCATGCTCCAGCAGGATTTTC-3'; SphI site underlined) and genomic DNA originated from the wild-type strain as well as from the different mutants as templates. The resulting fragments were introduced into pBAD18 vector digested with NheI and SphI, to yield pELI01, pELI02, pELI03 and pELI04 plasmids.

Plasmids pELI05 and pELI06 (Table 1) were constructed by generating PCR fragments encoding the *kis* and *kis74* alleles using primers KIS5N (+) (5'-GGCGAGCATATGGAGG TGAAGAAT-3'; NdeI site underlined) and KIS CTR (-) (5'-GCTGGATCCTCAGATTTCCTCTGAC-3' which introduces a BglII site) and plasmids pET80 and pAB1120, respectively, as DNA templates. PCR products bearing the *kis* alleles were introduced into pFUS2 after being digested with NdeI and BglII, resulting in the pELI05 and pELI06 plasmids.

To construct the pELI07 plasmid, a PCR fragment encoding *relE* was generated using primers relE1B and relE2 described in Gottfredsen *et al.* (1998) and genomic DNA from W3110 as template. The PCR product containing *relE* was introduced into pNDM220 after being digested with BamHI and SalI, yielding the pELI07 plasmid.

The pELI08 plasmid was constructed using a fragment containing the wild-type *prfA* gene generated from the diges-



tion of pELI02 with HindIII and NsiI inserted into the pFUS2 vector cleaved with the same enzymes.

The pELI09 plasmid was constructed by introducing a PCR fragment encoding *relB* into pFUS2 after a double digestion with NdeI and HindIII. The PCR fragment was generated using W3110 as DNA template and degenerated primers *relB*1 and *relB*2 described in Gottfredsen and Gerdes (1998), *relB*1 (5'-CCCCCGCATATGTAATTACAAGAGGTGTAAGAC-3') and *relB*2 (5'-CCCCTCGAGAAGCTTCAGAGTTCATCCAGCGTCACAGTACT-GG-3').

pKK1120 (*p15a*, *kis74*, *kid*) was constructed by ligating the 1.2 kb FspI-EcoRI fragment of pAB1120 containing the *kis74* (*amber*)-*kid* mutant operon and the 3.8 kb EcoRI-ScaI vector fragment from pACYC184.

#### Western blotting for readthrough assay

Cultures growing overnight in LB media were diluted 1:100 and induced with 1% arabinose when the OD<sub>600</sub> reached 0.1. At OD<sub>600</sub> 0.3, aliquots of 2 ml were centrifuged and the pellet was re-suspended in 60 µl of Laemmli buffer (Laemmli, 1970) and boiled for 10 min in order to obtain the cell lysates. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed with a Hoefer SE 260 apparatus in the presence of running buffer [Tris 0.025 M, glycine 0.192 M, SDS 0.1% (w/v) pH 8.5]. The separating gel contained 15% (w/v) of acrylamide. Following electrophoresis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Sequi-Blot™ Bio-Rad Laboratories) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell apparatus (Bio-Rad Laboratories) at a constant current of 12 V for 90 min at room temperature. PVDF membrane was blocked overnight in 137 mM NaCl, 0.1% (w/v) Tween 20 and 20 mM Tris/HCl, pH 7.5 (buffer TBST), at room temperature. The membrane was incubated for 1 h with the anti-Kis antibody diluted ×2000 in buffer TBST. The membrane was then washed four times by gentle agitation in buffer TBST for 30 min, incubated for 1 h with an anti-rabbit Ig linked to horseradish peroxidase and diluted ×10 000 (Amersham Biosciences) in buffer TBST. Subsequently the membrane was washed four times in buffer TBST for 30 min, the labelled Kis were revealed with enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Biosciences). Agfa films were exposed to the membranes and developed.

#### Assay for termination efficiency in vivo

Plasmids expressing MalE, fused to LacZα through a window containing the RF2 frameshift site, were as described by Poole *et al.* (1995). Parental and *prfA* mutant strains were transformed and grown in LB medium containing 200 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin and 200 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and induced with 1 mM IPTG for 2 h. Cell proteins were solubilized in SDS gel loading buffer and 3 or 6 µl aliquots were analysed by SDS-PAGE electrophoresis as described by Poole *et al.* (1995). Transfer to nitrocellulose membranes (Hybond C Super, GE Healthcare) and Western blotting with anti-MalE antibodies (Anti-MBP-antiserum, NEB) diluted ×5000 were performed as described by Sambrook *et al.* (1989), using <sup>125</sup>I-labelled protein A (GE Healthcare). Radioactivity was measured using a phosphorimager (Molecular Dynamics).

#### Western blotting of MalE fusion proteins

Cultures of strains transformed with plasmids expressing the MalE fusion proteins were grown in LB medium, 200 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin, 200 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin and induced with 1 mM IPTG as described for *in vivo* termination efficiency experiments. Aliquots of 1 ml of culture were centrifuged and the cells were lysed for 10 min at 100°C in 200 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol). Aliquots of 20 µl in the case of the parental strain MC1061 and volumes containing equivalent amounts of total protein in the case of the mutant strains were applied to 10% polyacrylamide gels for separation as described by Laemmli (1970). Transfer to nitrocellulose membranes, Western blotting with antibodies and quantification were performed as described above. Western blots were performed with rabbit anti-RF1 diluted ×5000 commercially prepared from pure factor.

#### Complementation assays

Cultures of strain MRA8 (*prfA1ts*) bearing pBAD-derivative plasmids (*prfA* wild type and mutants) were grown overnight at 30°C prior to being diluted 1:100 into two different aliquots of fresh medium (LB medium; ampicillin, 25 µg ml<sup>-1</sup>), with or without arabinose (0.2% v/v). The cultures were transferred to 42°C, and the OD<sub>600</sub> of both cultures was monitored every 20 min over a period of 160 min.

#### Toxicity assays

MC1061 wild-type and *prfA* mutant strains bearing pNDM220-derivative plasmids containing or not pELI08 were grown at 30°C to mid-exponential phase in LB broth plus ampicillin (50 µg µl<sup>-1</sup>) and kanamycin (as needed, 50 µg µl<sup>-1</sup>). The same strains containing the pFUS2 derivatives containing the antitoxin genes were grown in a similar way. Aliquots of the different cultures and serial dilutions (10<sup>-1</sup> steps) were spotted onto plates of the same solidified medium containing or not IPTG 100 µM as inducer of the toxins and were incubated at 30°C for 18 h. Antitoxins were induced using 0.5% arabinose. A semi-quantitative assessment of the relative levels of toxicity was derived from the differential dilution factor obtained for two spots presenting an equivalent number of colonies. Similar procedures were used to test the differential sensitivity of KR19 and MC1061 strains to the different antibiotics.

#### In vivo de novo synthesis of <sup>35</sup>S-labelled proteins

One millilitre of cultures of wild-type and mutant strains KR19 bearing pSS100 (*kid*) plus or not pELI08 (*prfAwt*) or pELI05 (*kis*), or KR19 bearing pELI07 (*relE*) plus or not pELI08 (*prfAwt*) or pELI09 (*relB*) were labelled with 14.3 µCi of [<sup>35</sup>S]Met/Cys (80:20, Amersham Biosciences) for 2 min at 37°C, then 1 mg of unlabelled methionine was added and incubation was continued for 8 min at 37°C. Cells were centrifuged at 20 000 g for 2 min at 4°C, the pellet was washed with a buffer containing KCl 3 mM, NaCl 68 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9 mM and re-suspended in 10 µl of



protein loading buffer 2× [0.05 M Tris-HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 0.01 M EDTA 25% (w/v), Bromophenol blue 0.5 g l<sup>-1</sup> and β-mercaptoethanol 5% (v/v)]. Proteins were separated by 12.5% SDS-PAGE and the radiolabelled products were identified by autoradiography.

## Acknowledgements

R.D.-O. was supported by Projects BFU2005-03911 and BFU2008-01566/BMC from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC, Spain) and by the COMBACT project of the CAM (Comunidad de Madrid, Spain). We thank Monica Rydén-Aulin (Stockholm University) for the generous gift of strain MRA8. M.L. was supported by a Postdoctoral Fellowship from the European Union (QLK2-CT-2000-00634) and a Postdoctoral Research Contract from the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF 2002-04649). E.D.-N. acknowledges the contribution of a predoctoral fellowship (BFI05.35) from the Basque Country Government, Spain. L.M. and R.H.B. thank Harry F. Noller for communicating atomic co-ordinates of the RF1:70S complex before release, and were supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (UPR9073) and Université Paris 7. The excellent technical assistance of Alicia Rodríguez Bernabé is also acknowledged.

## References

- Bachmann, B.J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* **36**: 525–557.
- Baranov, P.V., Gesteland, R.F., and Atkins, J.F. (2002) Release factor 2 frameshifting sites in different bacteria. *EMBO Rep* **3**: 373–377.
- Bernard, P., and Couturier, M. (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**: 735–745.
- Bravo, A., Ortega, S., de Torrontegui, G., and Diaz, R. (1988) Killing of *Escherichia coli* cells modulated by components of the stability system ParD of plasmid R1. *Mol Gen Genet* **215**: 146–151.
- Chopra, I., and Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 232–260.
- Christensen, S.K., Pedersen, K., Hansen, F.G., and Gerdes, K. (2003) Toxin–antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA. *J Mol Biol* **332**: 809–819.
- Condon, C. (2006) Shutdown decay of mRNA. *Mol Microbiol* **61**: 573–583.
- Curran, J.F., and Yarus, M. (1989) Rates of aminoacyl-tRNA selection at 29 sense codons *in vivo*. *J Mol Biol* **209**: 65–77.
- Dahlgren, A., and Rydén-Aulin, M. (2004) Effects of two cis-acting mutations on the regulation and expression of release factor one in *Escherichia coli*. *Biochimie* **86**: 431–438.
- Elliott, T. (1989) Cloning, genetic characterization, and nucleotide sequence of the *hemA-prfA* operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **171**: 3948–3960.
- Francois, B., Russell, R.J., Murray, J.B., Aboul-ela, F., Masquida, B., Vicens, Q., and Westhof, E. (2005) Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res* **33**: 5677–5690.
- Freistoffer, D.V., Pavlov, M.Y., MacDougall, J., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (1997) Release factor RF3 in *E. coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner. *EMBO J* **16**: 4126–4133.
- Freistoffer, D.V., Kwiatkowski, M., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (2000) The accuracy of codon recognition by polypeptide release factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2046–2051.
- Frolova, L.Y., Tsivkovskii, R.Y., Sivolobova, G.F., Oparina, N.Y., Serpinsky, O.I., Blinov, V.M., *et al.* (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* **5**: 1014–1020.
- Gao, H., Zhou, Z., Rawat, U., Huang, C., Bouakaz, L., Wang, C. *et al.* (2007) RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for dissociation of class I release factors. *Cell* **129**: 929–941.
- Gerdes, K., Christensen, S.K., and Lobner-Olsen, A. (2005) Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 371–382.
- Gottfredsen, M., and Gerdes, K. (1998) The *Escherichia coli* *relBE* genes belong to a new toxin–antitoxin gene family. *Mol Microbiol* **29**: 1065–1076.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121–4130.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557–580.
- Hansen, J.L., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2003) Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* **330**: 1061–1075.
- Hayes, C.S., and Sauer, R.T. (2003) Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translational quality control. *Mol Cell* **12**: 903–911.
- Ito, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (2000) A tripeptide ‘anticodon’ deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* **403**: 680–684.
- Kamphuis, M.B., Bonvin, A.M., Monti, M.C., Lemonnier, M., Munoz-Gomez, A., van den Heuvel, R.H., *et al.* (2006) Model for RNA binding and the catalytic site of the RNase Kid of the bacterial parD toxin–antitoxin system. *J Mol Biol* **357**: 115–126.
- Karimi, R., Pavlov, M.Y., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (1999) Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol Cell* **3**: 601–609.
- Kotra, L.P., Haddad, J., and Mobashery, S. (2000) Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial Agents Chemother* **44**: 3249–3256.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.

- Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., and Noller, H.F. (2008) Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* **454**: 852–857.
- Lemonnier, M., Bouet, J.Y., Libante, V., and Lane, D. (2000) Disruption of the F plasmid partition complex *in vivo* by partition protein SopA. *Mol Microbiol* **38**: 493–505.
- Li, X., Yokota, T., Ito, K., Nakamura, Y., and Aiba, H. (2007) Reduced action of polypeptide release factors induces mRNA cleavage and tmRNA tagging at stop codons in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **63**: 116–126.
- Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Moore, S.D., and Sauer, R.T. (2007) The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annu Rev Biochem* **76**: 101–124.
- Mora, L., Heurgue-Hamard, V., de Zamaroczy, M., Kervestin, S., and Buckingham, R.H. (2007) Methylation of bacterial release factors RF1 and RF2 is required for normal translation termination *in vivo*. *J Biol Chem* **282**: 35638–35645.
- Munoz-Gomez, A. (2004) Identificación y caracterización de la actividad RNasa de las toxinas bacterianas Kid y ChpAK. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid, p. 127.
- Munoz-Gomez, A.J., Santos-Sierra, S., Berzal-Herranz, A., Lemonnier, M., and Diaz-Orejas, R. (2004) Insights into the specificity of RNA cleavage by the *Escherichia coli* MazF toxin. *FEBS Lett* **567**: 316–320.
- Munoz-Gomez, A.J., Lemonnier, M., Santos-Sierra, S., Berzal-Herranz, A., and Diaz-Orejas, R. (2005) RNase/anti-RNase activities of the bacterial parD toxin–antitoxin system. *J Bacteriol* **187**: 3151–3157.
- Ogle, J.M., and Ramakrishnan, V. (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* **74**: 129–177.
- Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Tarry, M.J., Jr, Carter, A.P., and Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**: 897–902.
- Pedersen, K., Zavialov, A.V., Pavlov, M.Y., Elf, J., Gerdes, K., and Ehrenberg, M. (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* **112**: 131–140.
- Petry, S., Brodersen, D.E., Murphy, F.V.T., Dunham, C.M., Selmer, M., Tarry, M.J., et al. (2005) Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon. *Cell* **123**: 1255–1266.
- Poole, E.S., Brown, C.M., and Tate, W.P. (1995) The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of *in vivo* translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J* **14**: 151–158.
- Ronen, A. (1980) 2-Aminopurine. *Mutat Res* **75**: 1–47.
- Ryden, S.M., and Isaksson, L.A. (1984) A temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli* that shows enhanced misreading of UAG/A and increased efficiency for some tRNA nonsense suppressors. *Mol Gen Genet* **193**: 38–45.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Santos-Sierra, S., Pardo-Abarrio, C., Giraldo, R., and Diaz-Orejas, R. (2002) Genetic identification of two functional regions in the antitoxin of the parD killer system of plasmid R1. *FEMS Microbiol Lett* **206**: 115–119.
- Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., and Engelberg-Kulka, H. (2001) Programmed cell death in *Escherichia coli*: some antibiotics can trigger mazEF lethality. *J Bacteriol* **183**: 2041–2045.
- Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., and Nirenberg, M. (1968) Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc Natl Acad Sci USA* **61**: 768–774.
- Sunohara, T., Jojima, K., Tagami, H., Inada, T., and Aiba, H. (2004) Ribosome stalling during translation elongation induces cleavage of mRNA being translated in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**: 15368–15375.
- Takagi, H., Kakuta, Y., Okada, T., Yao, M., Tanaka, I., and Kimura, M. (2005) Crystal structure of archaeal toxin–antitoxin RelE–RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 327–331.
- Trobro, S., and Aqvist, J. (2007) A model for how ribosomal release factors induce peptidyl-tRNA cleavage in termination of protein synthesis. *Mol Cell* **27**: 758–766.
- Vestergaard, B., Sanyal, S., Roessle, M., Mora, L., Buckingham, R.H., Kastrop, J.S., et al. (2005) The SAXS solution structure of RF1 differs from its crystal structure and is similar to its ribosome bound cryo-EM structure. *Mol Cell* **20**: 929–938.
- Youngman, E.M., He, S.L., Nikstad, L.J., and Green, R. (2007) Stop codon recognition by release factors induces structural rearrangement of the ribosomal decoding center that is productive for peptide release. *Mol Cell* **28**: 533–543.
- Zavialov, A.V., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (2001) A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3. *Cell* **107**: 115–124.
- Zavialov, A.V., Mora, L., Buckingham, R.H., and Ehrenberg, M. (2002) Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3. *Mol Cell* **10**: 789–798.
- Zhang, J., Zhang, Y., Zhu, L., Suzuki, M., and Inouye, M. (2004) Interference of mRNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK. *J Biol Chem* **279**: 20678–20684.
- Zhang, S., Ryden-Aulin, M., Kirsebom, L.A., and Isaksson, L.A. (1994) Genetic implication for an interaction between release factor one and ribosomal protein L7/L12 *in vivo*. *J Mol Biol* **242**: 614–618.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hoefflich, K.P., Ikura, M., Qing, G., and Inouye, M. (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **12**: 913–923.





## A mutagenic analysis of the RNase mechanism of the bacterial Kid toxin by mass spectrometry

Elizabeth Diago-Navarro<sup>1</sup>, Monique B. Kamphuis<sup>2</sup>, Rolf Boelens<sup>2</sup>, Arjan Barendregt<sup>3</sup>, Albert J. Heck<sup>3</sup>, Robert H. van den Heuvel<sup>3,\*</sup> and Ramón Díaz-Orejas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas, Departamento de Microbiología Molecular, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Bijvoet Center for Biomolecular Research, Department of NMR Spectroscopy, Utrecht University, The Netherlands

<sup>3</sup> Bijvoet Center for Biomolecular Research, Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics group, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, The Netherlands

### Keywords

Kid mutants; Kid RNase model; native mass spectrometry; protein–RNA binding; protein–RNA cleavage

### Correspondence

R. Díaz-Orejas, Centro de Investigaciones Biológicas, Departamento de Microbiología Molecular, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain  
Fax: +34 915 360 432  
Tel: +34 918 373 112  
E-mail: ramondiaz@cib.csic.es

### \*Present address

Schering-Plough Biotech Quality Unit, Oss, The Netherlands

(Received 17 May 2009, revised 1 July 2009, accepted 6 July 2009)

doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07199.x

Kid, the toxin of the *parD* (*kis*, *kid*) maintenance system of plasmid R1, is an endoribonuclease that preferentially cleaves RNA at the 5' of A in the core sequence 5'-UA(A/C)-3'. A model of the Kid toxin interacting with the uncleavable mimetic 5'-AdUACA-3' is available. To evaluate this model, a significant collection of mutants in some of the key residues proposed to be involved in RNA binding (T46, A55, T69 and R85) or RNA cleavage (R73, D75 and H17) were analysed by mass spectrometry in RNA binding and cleavage assays. A pair of substrates, 5'-AUACA-3', and its uncleavable mimetic 5'-AdUACA-3', used to establish the model and structure of the Kid–RNA complex, were used in both the RNA cleavage and binding assays. A second RNA substrate, 5'-UUACU-3' efficiently cleaved by Kid both *in vivo* and *in vitro*, was also used in the cleavage assays. Compared with the wild-type protein, mutations in the residues of the catalytic site abolished RNA cleavage without substantially altering RNA binding. Mutations in residues proposed to be involved in RNA binding show reduced binding efficiency and a corresponding decrease in RNA cleavage efficiency. The cleavage profiles of the different mutants were similar with the two substrates used, but RNA cleavage required much lower protein concentrations when the 5'-UUACU-3' substrate was used. Protein synthesis and growth assays are consistent with there being a correlation between the RNase activity of Kid and its inhibitory potential. These results give important support to the available models of Kid RNase and the Kid–RNA complex.

## Introduction

Toxin–antitoxin systems were discovered as bacterial plasmid maintenance systems. The first ones to be reported were the *ccd* (*ccdA*, *ccdB*) system of plasmid F [1] and the *hok-sok* [2] and *parD* (*kis*, *kid*) systems of plasmid R1 [3]. Since these first reports, many other toxin–antitoxin systems have been found in plasmids and/or the chromosomes of bacteria and archaea, and their roles, relationships and biotechnological projections have attracted considerable attention [4–7].

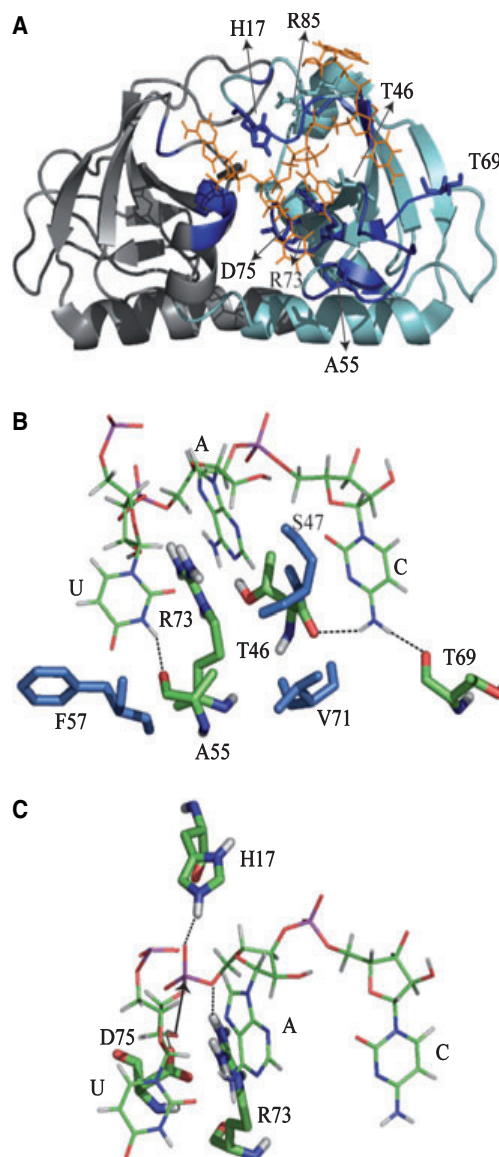
The *parD* (*kis*, *kid*) system is localized in a region adjacent to the basic replicon of plasmid R1 [3]. This

system is organized as an operon that is regulated at the transcriptional and post-transcriptional levels [8–10]. Decay of the Kis antitoxin, presumably caused by the action of the Lon protease [11], also has a role in *parD* (*kis*, *kid*) regulation and toxin activation. The Kid toxin is an endoribonuclease that in solution preferentially targets RNA at the 5' of A in the nucleotide sequence 5'-UA(C/A)-3' of single-stranded regions [12]. Basically, the same results were obtained with PemK of plasmid R100, which is identical to Kid of plasmid R1 [13]: this toxin cuts RNA *in vitro* at the



5'-UA(C/A/U)-3' sequence, preferentially between U and A and in single-stranded regions, although cleavage at 3' of A was also found. Zhang *et al.* [14] found cleavage *in vivo* by PemK at sequences containing the 5'-UAC-3' core. Pimentel *et al.* found that Kid preferentially cleaves RNA *in vivo* at the 5'-UUACU-3' sequences, between U and A, and that cleavage at this sequence downstream of the *copB* region in the polycistronic *copB-repA* mRNA of plasmid R1 downregulates levels of the CopB repressor and increases the RepA/CopB ratio and plasmid R1 copy number. This has been proposed to play a role in correcting fluctuations in plasmid R1 copy number [15] and provides mechanistic support to previous observations by Ruiz-Echevarría *et al.* [16].

Important information on the basic mechanisms of RNA cleavage by RNases can be obtained using minimal RNA substrates [17,18]. In the case of the Kid toxin, using the minimal substrates 5'-AUACA-3' and UpA, a 2' : 3'-cyclic phosphate intermediate of the cleavage reaction was identified [19], meaning that, similar to RNase T1, Kid is a cyclizing RNase [17]. Basic cleavage of RNA by Kid occurs via the 2' : 3'-cyclic phosphate group and is initiated by a nucleophilic attack on the adjacent phosphate by the 2' oxygen in the ribose. A catalytic base activates the attacking oxygen and a catalytic acid donates a proton to the 5' oxygen of the leaving base. In a second step, a 3'-monophosphate nucleotide is formed by hydrolysis of the 2' : 3'-cyclophosphate group. Additional interactions stabilize the initial intermediate of the reaction. Following determination of the structure of the complex between the Kid toxin and the RNA substrate 5'-AUACA-3' [19], key residues presumably involved in RNA binding and cleavage were identified. The structure of this complex was, in fact, an elaborate model obtained by docking the RNA substrate on the predetermined NMR structure of the toxin. Docking was constrained to adjust to: (a) chemical shift perturbations induced by the interaction of the toxin with an uncleavable mimic RNA substrate, (b) the cleavage mechanism, and (c) preliminary information on mutants that abolish Kid toxicity. According to this model, Kid contains two symmetric and continuous RNA-binding pockets, each involving residues of both monomers (Fig. 1A). Residues E18 of one monomer and R85 of the other are connected via a salt bridge. Mutations in these residues subtly destabilize the structure of the toxin and abolish the toxicity of Kid [20]. Residues T46, S47, A55, F57, T69, V71 and R73 interact with bases in the core sequence of the RNA substrate (5'-UAC-3') and contribute to the definition of the specificity of the sequence recognized by the toxin



**Fig. 1.** Graphic representation of Kid residues involved in RNA binding specificity and cleavage. (A) Kid dimer with the residues involved in RNA binding in blue. The analysed residues are indicated. (B) Residues involved in the binding specificity. (C) Residues involved in RNA cleavage. In (B) and (C) only the RNA bases of the core sequence cleaved by the Kid toxin, UAC, are shown. Dotted lines indicate the hydrogen bonds. Colour codes of the different atoms are as follows: C, green; H, white; O, red and N, blue. Non-analysed residues are shown in marine blue. The figure was obtained using PYMOL [36].

(Fig. 1B). Native MS showed that the toxin dimer binds to a single RNA molecule [19], suggesting that the second binding pocket is inactivated following binding of the RNA substrate to the first. The model proposes that residues D75, R73 and H17 are part of the active site of the enzyme acting as a catalytic base,

catalytic acid and stabilizing residue, respectively (Fig. 1C). Mutations in R73 and D75 that abolish Kid toxicity have been reported previously [20]. Surprisingly, R73 is not conserved among MazF and other Kid homologues. The acidic residue at position 75 (D or E), acting as a catalytic base, is present in MazF and almost all other Kid-related toxins [21]. Interestingly ChpBK, an homologous Kid toxin of the *Escherichia coli* chromosome contains glutamine instead of the acidic residue at this position and has reduced endoribonuclease activity compared with MazF [19,22]. A significant evaluation of the available model on the interaction and cleavage of the RNA substrate and the Kid toxin is of interest in itself because it is the basis of important cellular roles of this toxin in plasmid stabilization and the inhibition of cell growth; it should also set an important point of reference for comparisons with other toxins.

In this study, we evaluate the above model by testing a limited, but significant, collection of specific mutations in key residues of the protein and by analysing *in vitro* their effects on RNA binding and RNA cleavage using short RNA substrates and native MS assays. Our analysis focuses on the protein residues proposed to be involved in RNA binding and cleavage, and strives to analyse the effect of mutations in these residues on binding and cleavage at the 5'-UAC-3 core sequence using an *in vitro* approach. This core was present at the highest frequency in RNA sequences cleaved by PemK/Kid toxins *in vitro* and *in vivo* [12,14,15]. Cleavage at this core occurred most frequently between U and A. For our purpose, we require short RNA substrates containing the above core sequence. For the cleavage assays, we chose two short RNAs, 5'-AUACA-3' which, jointly with the dinucleotide UpA, was the main substrate used to analyse the cleavage products of Kid, and 5'-UUACU-3' which is a preferred target for Kid *in vivo*, as described by Pimentel *et al.* [15], and which is also cleaved efficiently by Kid *in vitro* [19]. Selection of these short substrates allowed the use of MS in the cleavage assays. RNA binding was assayed on 5'-AdUACA-3', the un-cleavable mimetic of 5'-AUACA-3'. This mimetic RNA was used to obtain NMR data that supported the Kid-RNA structural model and it also allowed us to establish the requirement for OH in the 2' position for RNA cleavage. The effects of the mutations on toxicity and protein synthesis assays were also tested. The results obtained are consistent with the model's predictions and show the important contribution of the T46 residue to RNA cleavage. These results also show a good correlation between RNase activity, protein synthesis inhibition and *in vivo* inhibition of

cell growth, underlining their relevance to our understanding of the basic activities of this toxin.

## Results

### Selection and isolation of Kid mutants in residues involved in RNA binding and in RNA cleavage

To evaluate the model's predictions on residues involved in RNA binding we selected and analysed four Kid mutants: A55G, T46G, T69G and R85W. A55, T46 and T69 establish hydrogen bonds (Fig. 1B, dotted lines) and hydrophobic interactions with bases of the core sequence 5'-UAC-3' and they are proposed to contribute to Kid-RNA binding specificity. Single mutations in these residues could affect binding of the toxin to the RNA substrate without inactivating its RNase. However, because of the contribution made by other residues to RNA binding specificity (see above), single mutations in these residues may retain measurable RNA-binding potential. R85 does not interact directly with bases at the core sequence 5'-UAC-3'. However, it plays an important role in RNA binding because it establishes a salt bridge with E18, connecting the two monomers of the toxin, as required to form the two RNA-binding pockets. KidR85W prevents this salt bridge and locally distorts the structure of the dimer [20]. Therefore, this mutation may have a drastic effect on RNA binding which would explain its highly reduced RNase activity [23].

As mentioned above, R73, D75 and H17 are proposed to form part of the active centre of the toxin (Fig. 1C). For a detailed analysis we selected the mutants KidD75E, KidD75N, KidR73H and KidH17P. These mutations should interfere with the interactions required for catalysis and therefore have a drastic effect on the RNase activity of the toxin and a moderate or null effect on RNA binding.

Kid mutants suitable for the analysis should affect specifically the RNA binding and/or cleavage activities without altering other essential protein features and functions, such as its structure, stability and potential to interact with the antitoxin. The possible effects of the mutations on the stability and structure of the protein were analysed by immunoblotting and CD, respectively. The potential of the Kid mutants to form a functional complex with the Kis antitoxin was evaluated by using native MS to test the formation of a stable heterooctameric Kid<sub>2</sub>-Kis<sub>2</sub>-Kid<sub>2</sub>-Kis<sub>2</sub> complex on the *parD* promoter [9]. We further analysed the effects of the mutations on the co-regulatory activity of the toxin, measuring their effect on the transcription

of a *parD-lacZ* transcriptional fusion [24]. These assays indicated that the different mutants maintain the structural and functional features required to test their specific involvement in RNA binding and/or RNA cleavage activities (Figs S1–S3).

### Mutations in residues proposed to be involved in RNA interactions decrease RNA binding

The Kid mutants A55G, T69G, T46G, the double mutants T46G/T69G and A55G/T69G, and R85W affecting residues proposed to be involved in interactions with the RNA substrate were evaluated in RNA binding and cleavage assays.

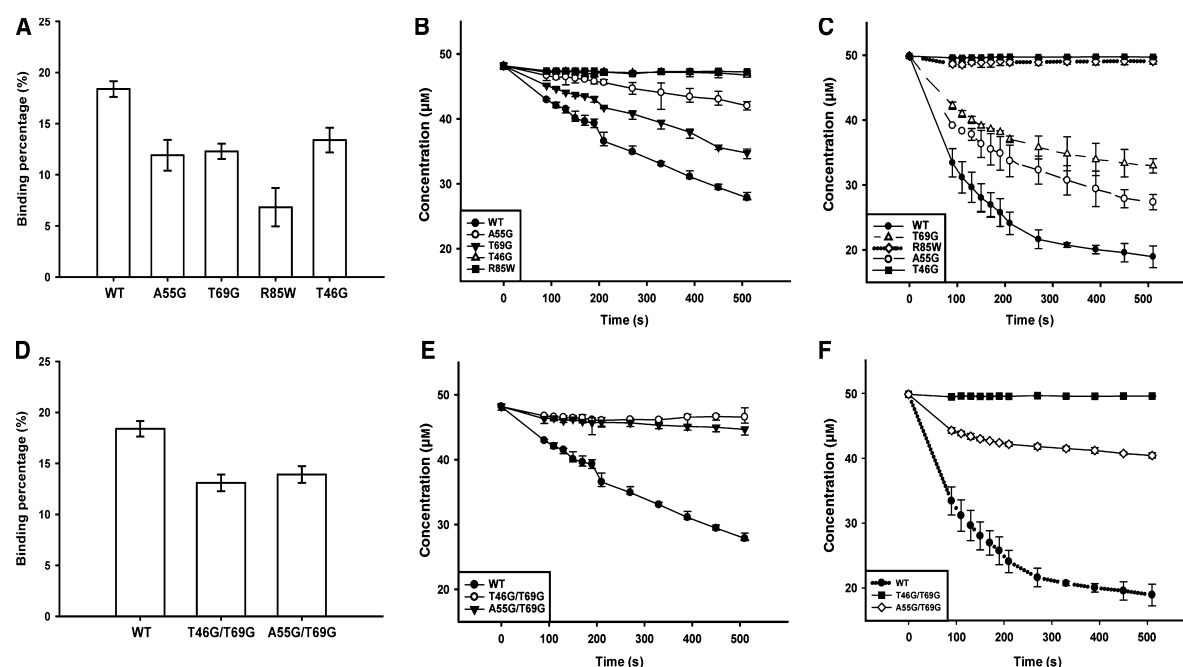
To perform this analysis, we chose to use native MS [25,26], a novel development in the field of MS using relatively soft ionization of the sample by electrospray ionization from solutions at physiological pH, which enables the maintenance, detection and analysis of macromolecular complexes. These protein complexes are detected at different mass-to-charge ratios ( $m/z$ ), separated by differences in their time-of-flight inside the mass analyser. Here, we use this new powerful technology to analyse complexes of the Kid toxin with short RNA substrates, circumventing the inconvenience associated with more conventional methodologies (e.g. dissociation of the complexes when using electrophoretic separation techniques). The MS analysis is efficient and very sensitive, and it was particularly useful for comparisons of the different mutational variants of the same protein.

For RNA binding assays, a RNA-dU substrate that could not be cleaved, 5'-AdUACA-3', in which the attacking OH of the ribose was replaced by a proton H (deoxyribose), was used. This substrate was also used to model the binding of Kid to the RNA, and contains in its central core the bases at which cleavage occurs in the target sequences identified previously [12,14,15]. In all cases, analysis by native MS of samples containing equimolar concentrations of the toxin (wild-type or mutants) and RNA binding substrate, detected five peaks corresponding to different ionization forms of the free dimeric toxin and also peaks corresponding to the complex of the dimeric toxin and a single RNA molecule (Fig. S4). Compared with Kid wild-type protein, in which  $18.4 \pm 0.8\%$  of the protein was bound, a statistically significant decrease in the relative binding was clear for KidA55G ( $11.9 \pm 1.5\%$ ), KidT69G ( $12.3 \pm 0.8\%$ ) and KidT46G ( $13.4 \pm 1.2\%$ ) (Fig. 2A). This indicates that A55, T69 and T46 residues make a significant contribution to the RNA binding, but there are no significant differences between the binding strength of these mutated

proteins to the RNA substrate. For KidR85W, the percentage of the protein–RNA complex with respect to the free protein was drastically reduced ( $6.8 \pm 1.9\%$ ), indicating that the mutation efficiently affected binding of the toxin to the RNA substrate.

MS analysis was also used to follow the activity of Kid wild-type and mutant proteins on the cleavable substrate 5'-AUACA-3' used in the model [19], which also contains the UAC core sequence. The progress of the reaction over time was determined by measuring the amount of uncleaved RNA remaining (Fig. 2B) and the concomitant formation of RNA cleavage products. Only products observed in all cases corresponded to the expected species of a specific cleavage (AU, 636.1 Da and ACA, 902.2 Da, data not shown), thus indicating that the samples used were not contaminated with an unspecific RNase. Similar results were obtained for the RNA 5'-UUACU-3', but with this substrate the assay required a 100-fold decrease in protein concentration, as reported previously [19] (Fig. 2C). The expected cleavage products were found in all reactions (Fig. S5), (UU, 614 Da and ACU, 880 Da), similarly indicating that samples were not contaminated with a nonspecific RNase. The amount of nonprocessed RNA obtained with KidA55G and KidT69G decreased gradually over time, whereas the RNA cleavage products increased concomitantly at the same rate. The cleavage profiles obtained when the 5'-UUACU-3' substrate was used were quite similar to those obtained with 5'-AUACA-3' (Fig. 2B,C). This indicates that these mutants retain substantial RNase activity. However, in both cases, the levels of cleavage obtained with KidA55G and KidT69G were lower than those obtained with the wild-type protein, probably because of the effect of these mutations on RNA binding. This interpretation is supported by the results obtained with KidR85W: the interaction of KidR85W and RNA was drastically reduced and this correlates with the very low RNase activity of this mutant (Fig. 2). Further analysis of this activity on longer RNA substrates (CopT or CopA, which are RNA regulatory elements of R1 plasmid replication, and TAR, a regulatory region of the RNA of the HIV virus) show a highly reduced but detectable RNase activity in this mutant [12] (data not shown) (see Discussion). The T46G mutation also produced a drastic reduction in the RNA cleavage on both short and full-length RNA substrates, although substantial RNA binding activity continued to be measured; possible alternative explanations for this result are given in the Discussion. The RNA binding and cleavage assays were also performed with the double mutants KidA55G/T69G and KidT46G/T69G affecting residues involved in specific





**Fig. 2.** Effect on RNA binding and cleavage of mutations in Kid residues, as measured by native MS (see Figs S4 and S5). RNA binding: assays were performed with Kid wild-type, mutated proteins using a noncleavable mimetic RNA substrate (5'-AdUACA-3'). Protein and RNA were added at 15 μM. (A) and (D) show the percentage of protein bound to RNA relative to the total protein for Kid wild-type and Kid mutants containing single or double mutations as indicated (rectangles). Bars indicate SD. RNA cleavage assays were performed using proteins at 20 μM and the cleavable RNA substrate, 5'-AUACA-3', at 50 μM in (B) and (E), whereas in (C) and (F) the cleavable substrate 5'-UUACU-3' was used at 50 μM and the proteins were used at 0.2 μM. The amount of uncleaved RNA remaining at different times, with Kid wild-type and mutant proteins is indicated. (B) and (C) show the line profiles obtained with single mutants, and (E) and (F) the profiles obtained with the double mutants. SD for each value were calculated from three independent measures.

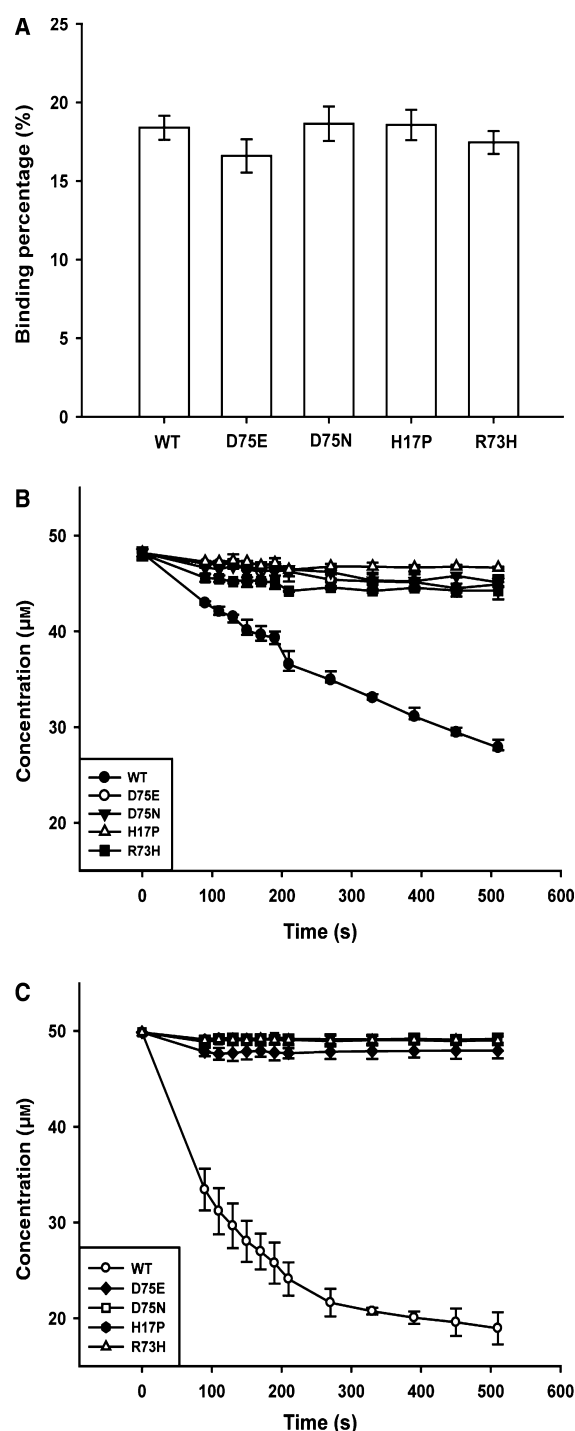
interactions with the RNA. These double mutants, like the Kid wild-type protein, interact efficiently with the Kis antitoxin (data not shown) and form proper Kid–Kis complexes (heterooctamers) at the promoter–operator region (see Fig. S2), showing that they maintain the functional features required to test their specific involvement in RNA binding and/or cleavage activities. We analysed the ability of these double mutants to bind RNA, and the relative values found were  $13.1 \pm 0.8\%$  for KidT46G/T69G and  $13.9 \pm 0.8\%$  for KidA55G/T69G, similar to values obtained with the single mutants ( $13.4 \pm 1.2\%$  for T46G,  $12.3 \pm 0.8\%$  for T69G and  $11.9 \pm 1.5\%$  for A55G) (Fig. 2A,D). All the data were statistically different compared with the wild-type protein. Further differences were observed when the cleavage assay was performed (Fig. 2B–F). The Kid protein containing the double mutation A55G/T69G showed a further decrease in the efficiency of RNA cleavage when compared with Kid proteins containing the single mutations. It was observed that this decrease was more pronounced when the less-preferred 5'-AUACA-3' substrate was used; however, RNase activity was

clearly shown when the 5'-UUACU-3' substrate was used (Fig. 2F). The double mutant KidT46G/T69G, like the KidT46G single mutant, prevented the cleavage of both short RNA substrates.

### Mutations affecting catalytic residues of Kid prevent RNA cleavage but not RNA binding

As indicated above, mutants KidR73H, KidD75E, KidD75N and KidH17P affect residues proposed to be involved directly in the cleavage of the RNA substrate. The effects of these mutations on RNA-binding and cleavage assays were evaluated.

A RNA binding assay of the different mutants was performed using native MS, as indicated above. In all cases, the relative binding percentages of KidD75E, KidD75N, KidH17P and KidR73H ( $16.6 \pm 1.1$ ,  $18.6 \pm 1.1$ ,  $18.6 \pm 1.0$  and  $17.5 \pm 0.7$ , respectively) were similar to that of the wild-type ( $18.4 \pm 0.8\%$ ), indicating that these mutations do not substantially affect RNA binding (Fig. 3A). No statistically significant differences from the wild-type protein were found.



The rates of cleavage of the cleavable RNA substrate by the Kid wild-type and mutant proteins were followed by MS, monitoring the amount of remaining uncleaved RNA, 5'-AUACU-3' and 5'-UUACU-3', over time (Fig. 3B,C). Compared with the wild-type protein, a decrease in the uncleaved RNA over time was not observed for all four mutants. A similar effect was found with both substrates when the appropriate protein concentration (0.2 μM for 5'-UUACU-3' and

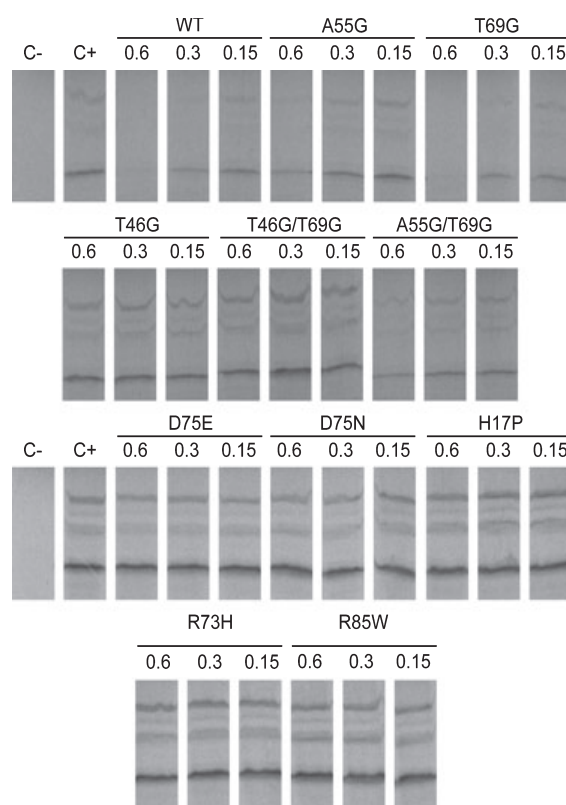
**Fig. 3.** RNA binding and cleavage of Kid mutants affected in residues in the catalytic centre. (A) RNA binding: assays were carried out by native MS. The uncleavable RNA (5'-AdUACA-3') was incubated for 2 min with Kid wild-type or mutated proteins. RNA and proteins were added at 15 μM and the ratios of RNA bound protein to free protein obtained for the different mutants (rectangles) were determined. Bars show the SD obtained for the wild-type or mutant proteins from three independent assays. (B) RNA cleavage assays were performed using proteins at 20 μM when the cleavable substrate 5'-AUACA-3' was used at 50 μM. (C) RNA cleavage assays with 50 μM of the cleavable substrate 5'-UUACU-3' and 0.2 μM of proteins. The amount of uncleaved RNA remaining at different times after the addition of Kid wild-type or mutant proteins is indicated. The profiles obtained for the different mutants are indicated. SD for each value were calculated from three independent measures.

20 μM for 5'-AUACU-3') was used. This indicates that the mutations inactivate the RNase activity of the toxin to a great extent. Analysis using longer RNA substrates confirmed this inactivation (data not shown).

On the whole, the results are consistent with the specific involvement of R73, D75 and H17 in the cleavage reaction (see Discussion) and also indicate that this is not because of the mutations having a significant effect on the binding to the RNA substrate.

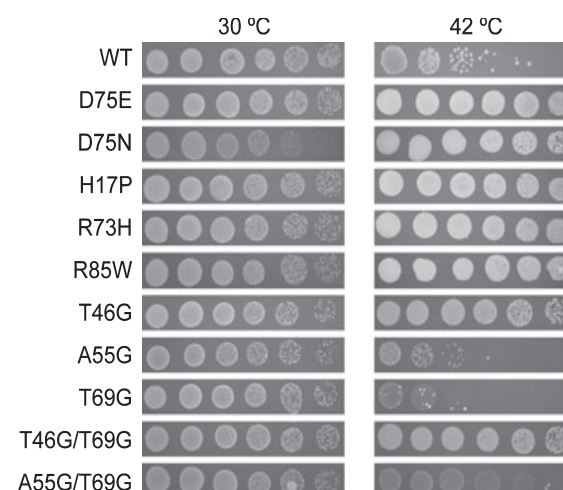
### Protein synthesis and toxicity assays are consistent with the above results

We tested the effects of the Kid mutations on protein synthesis by monitoring Luciferase synthesis in *E. coli* cell extracts (see Materials and methods). Protein synthesis was inhibited by the wild-type Kid protein, the KidT69G mutant and to a lesser extent by KidA55G (Fig. 4). The double mutant KidA55G/T69G was also able to inhibit protein synthesis but to a lesser extent than the single mutants, even when the highest protein concentration was used (0.6 μM). This is consistent with the fact that these mutants, which partially affect RNA binding, do not abolish the RNase activity of the toxin. A different result was obtained with Kid mutants KidR73H, KidD75E, KidD75N and KidH17P, which affect residues in the catalytic centre. These mutations abolished the potential of the toxin to inhibit protein synthesis. The same result was obtained for the KidR85W mutant protein (Fig. 4), which is consistent with a drastic reduction in RNA binding and RNase activity in this mutant (see Discussion). KidT46G was not able to inhibit protein synthesis, which is consistent with its failure to cleave RNA. Similarly, the double mutant KidT46G/T69G was also unable to inhibit protein synthesis.



**Fig. 4.** Protein synthesis assays with the different mutants. Effect of the Kid wild-type and mutant proteins (0.15, 0.3, 0.6  $\mu\text{M}$  in each case) on the synthesis of a [ $^{35}\text{S}$ ]methionine-labelled Luciferase in an *in vitro* transcription–translation assay. C+ shows the positive controls with buffer, C– the negative controls with chloramphenicol (1  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), the remaining lanes show assays carried out in the presence of different concentrations of Kid wild-type, KidA55G, KidT69G, KidT46G, KidT46G/T69G and KidA55G/T69G, KidD75E, KidD75N, KidR73H, KidH17P and KidR85W proteins.

We analysed the effects of the above mutants on the growth and viability of the host. For this purpose, the different mutations were introduced by site-directed mutagenesis into multicopy *parD* recombinant vectors pBR1120 or pAB1120. These vectors carry an amber mutation in the *Kis* antitoxin (*kis74*) and they were established at 30 °C in OV2, a thermosensitive amber suppressor (*supFts*) strain. In this background, a functional antitoxin is synthesized at 30 °C, whereas at 42 °C an inactive antitoxin with the last 13 residues removed is synthesized. Therefore, the effect of the toxin on cell growth or cultivability can be monitored at 42 °C. Analysis showed that at 30 °C, cultures expressing the different Kid mutant proteins affecting the proposed catalytic or RNA binding residues grew with similar efficiency and viability. At 42 °C, cells expressing the non-neutralized Kid proteins carrying mutations in the catalytic residues grew normally



**Fig. 5.** Cell cultivability of strains containing different Kid mutants. OV2 strain containing *kid* wild-type or the different *kid* mutants were grown at 30 °C to mid-logarithmic phase ( $D_{600} = 0.35$ ) and equal volumes of serial dilutions were spotted in plates containing the appropriate antibiotic (tetracycline or kanamycin). Growth of the spotted samples after 16 h of incubation at 30 or 42 °C is shown.

(Fig. 5). As expected, the growth of cells expressing the wild-type toxin was clearly affected. T69G and A55G mutations showed a similar inhibitory effect, despite differences in their potential to inhibit protein synthesis and, in addition, their inhibitory effects were greater than that of the wild-type (see Discussion). A different situation was found in cells carrying the recombinant containing the R85W mutation. As shown above, this mutation drastically affected Kid RNA binding and, as previously reported [20], the KidR85W toxin did not inhibit cell growth. Consistent with the above results, KidT46G and KidT46G/T69G did not affect cell growth or viability (Fig. 5). The double mutant KidA55G/T69G showed a milder effect on cell growth than either of the single mutants, which is consistent with the RNA cleavage and protein synthesis assays.

## Discussion

In this study, we evaluated the roles assigned by the available model to particular residues of Kid involved in RNA binding or cleavage [19]. As mentioned above, for the cleavage assays we chose two short RNAs: 5'-AUACA-3', previously used to analyse the cleavage products of Kid [19]; and 5'-UUACU-3', a preferred target of Kid *in vivo* and *in vitro* [15,19]. Selection of these short substrates allowed us to use MS in the Kid–RNA binding and cleavage assays. 5'-AdUACA-3',

the un-cleavable mimetic of 5'-AUACA-3' was used in the binding assays. For the analysis, we selected four single mutants of Kid, A55G, T69G, T46G and R85W, and two double mutants, A55G/T69G and T46G/T69G, which affect residues proposed to be involved in RNA binding. Four other mutants, R73H, D75E, D75N and H17P, which affect residues proposed to form part of the catalytic centre of Kid were also selected (Fig. 1). Because these mutations do not substantially alter the stability or secondary structure of the Kid toxin and maintain its capacity to interact with the Kis antitoxin and form a functional repressor, they seem appropriate for evaluation of their specific effects on RNA binding and RNA cleavage.

A55 and T69 confer specificity to the interaction with RNA because they establish hydrogen bonds with bases at the RNA core sequence recognized by Kid (Fig. 1B, dotted lines). They are located in flexible regions of the toxin (Fig. 1A). Substitution of these residues by glycine abolished interactions with the bases without disturbing the structure of the flexible region in which they are located. The fact that these substitutions affect RNA binding in a clear way without preventing cleavage of the RNA substrate is consistent with the proposal that these residues play an important and specific role in RNA binding. A decrease in cleavage efficiency was observed, probably as an indirect result of less efficient binding to the substrate. This decrease was similar in both mutated proteins. Consistent with the above analysis, it was found that the mutations conserve the ability of the toxin to inhibit protein synthesis and show expected effects on cell growth and viability. KidA55G seems to inhibit protein synthesis to a lesser extent than KidT69G, but this is not reflected by differences in cell growth. In addition, inhibition of cell growth is more pronounced in both mutants than in the wild-type protein. Because the system used to assay Kid toxicity depends on inactivation of the Kis antitoxin at 42 °C, it cannot be discounted that these differences are caused by unknown complexities related to this assay.

KidT46G shows an effect on RNA binding of Kid similar to KidA55G and KidT69G, but unlike these mutations it shows drastic inhibition of RNA cleavage. Results obtained on the larger RNA substrates show residual RNase activity that does not indicate changes in cleavage specificity. Because the mutation should extend to the adjacent S3-S4 loop (residues 47–57), which is a dynamic region of the protein (M.B. Kamphuis, unpublished data), a plausible hypothesis is that it may allow adjacent residues to interfere with others on the active site. A possible alternative is that T46G may interfere with correct binding of the RNA

substrate and that this could allow RNA binding but prevent efficient RNA cleavage. T46 is highly conserved in the alignment [21], which may suggest its possible relevance in the specific recognition of the substrate.

A drastic effect on RNA binding was found for KidR85W. R85 stabilizes the RNA binding pocket by forming a salt bridge with E18. R85W mutation abolishes this salt bridge causing disruption of the binding pocket [20], loss of the positive charge of R85 and full exposure to the negative charge of E18 [20]. This, in turn, may explain the very poor activity of this toxin as an RNase. In addition, local distortion in the S1-S2 loop comprising residues 11–21 may also contribute to this poor activity because this loop includes the H17 residue which is proposed to play a stabilizing role in RNA cleavage. Previous RNase assays in solution with larger RNA substrates (TAR, CopA and CopT) show that, although with poor efficiency, the KidR85W mutant can cleave RNA with the correct specificity; this is consistent with the proposal that the mutation does not completely prevent the RNase activity of Kid or alter the cleavage specificity. As reported previously, the R85W mutation impairs the toxicity of the Kid protein. The decrease in RNase activity seen in pure solutions was undetectable in whole-cell extracts of *E. coli* [12], which is consistent with the effect of the mutation on toxicity. The reasons for the differences found in pure solutions and whole cells or in cell-free extracts remain to be established.

Mutations R73H, D75N, D75E and H17P clearly affect RNA cleavage without substantially altering RNA binding. The relative positions and functions that R73, D75 and H17 of Kid play to cleave the scissile phosphate (catalytic acid, catalytic base and stabilizing interaction) are equivalent to those of residues at the active sites of RNaseA and RNase T1 [19]. The mutations analysed should disrupt the critical interactions of the three key residues. (a) R73H: arginine and histidine are monocarboxylic acids with amine bases, but the size and stereochemistry of the two lateral chains are quite different, which prevents the effective substitution of the two amine bases of arginine 73 by the two amines of histidine. In addition to act as a catalytic acid, R73 can play a second function in RNA cleavage: reducing the  $pK_a$  of the 2'-OH group by donating a charged hydrogen bond to the 2'-O. This can be accomplished by a single arginine, but not by just one histidine. Note that although this residue was proposed to contribute to the specificity of binding to the core sequence [19], we could not measure an effect of the mutation on RNA binding. This suggests that the residue does not play a relevant role in this



binding, or that the histidine amines can fulfil this additional role of R73. (b) D75N: aspartic acid and asparagine are, respectively, a dicarboxylic acid and its amide. The stereochemistry of both residues might be equivalent but the mutation changes the acidic character of D75 which is required for its proposed role as the catalytic base. (c) D75E: aspartic and glutamic acids are dicarboxylic acids, but glutamic acid has an additional carbon in the lateral chain. The clear effect of this change in the RNase activity indicates that even if the acidic character is conserved, the length of the lateral chain is important to establish the necessary catalytic interactions. Using longer and well-characterized substrates such as TAR (the regulatory region of HIV), CopA and CopT (two RNAs involved in copy number control of plasmid R1) we found that this mutant has residual but specific RNase activity (data not shown); this indicates that the acidic residue may play a catalytic role, although far less efficiently than D75. Thus the two substitutions in this residue are consistent with the proposed role of D75 as the catalytic base. (d) H17P changes the pyrrolic ring of histidine, which includes the amine that establishes a hydrogen bond with the oxygen of the scissile phosphate, for the heterocyclic ring of proline containing three uncharged CH<sub>2</sub> residues; this substitution prevents the required hydrogen-bond formation proposed by the model. These results are consistent with the essential roles assigned to these residues in the available model. In particular, the two substitutions in D75 strongly support its role as catalytic acid.

It should be taken into account that translation factors or the translation process itself may influence the mode of action or the accessibility to the target of related RNase toxins. In the case of the YafQ toxin, the target found *in vivo* is in inframe codons of lysine, whereas *in vitro* the toxin cuts close to a GG pair [27]. The translation process itself has been shown to increase the accessibility to the targeted sequences for the MazF toxin [28]. Finally, the releasing factor RF1, which competes with the action of the RelE toxin *in vitro* [29], is also involved in the toxicity mediated by both the RelE and the Kid toxins; this was revealed by the extra sensitivity of *prfA* mutants to these toxins [30]. Further work is required to determine the interactions involved in this extra sensitivity.

From the work of Pimentel *et al.* [15], it seems quite clear that preferential cleavage by Kid of the *copB-repA* mRNA of plasmid RI at the 5'-UUACU-3' sequence is very important to fine tuning the CopB/RepA ratio and the replication efficiency of the plas-

mid. Cleavage at these sequences in other mRNAs may have an important role in the protein synthesis and cell growth inhibition mediated by this toxin. 5'-UUACU-3' is not the only sequence targeted *in vivo* by the Kid/PemK toxin. Zhang *et al.* [14] reported the cleavage of RNA by PemK *in vivo* at 5'-CUACU-3' and 5'-CUACG-3', both having the 5'-UAC-3' core sequence found in 5'-UUACU-3'. An interesting point in this context is the possible functional relevance of cleavage by this toxin at less favourable sites containing the core sequence. It remains to be evaluated if this represents a way of regulating the action of the toxin. The data reported by Zhang *et al.* that cleavage by PemK can occur at the 5' or 3' A in the core sequence, adds complexity to this repertoire of sites and remains to be explained at the mechanistic level.

To summarize, our results are consistent with the functions assigned in the available model to R73, D75 and H17 of Kid as catalytic residues involved in RNA cleavage and the role of T46, A55, T69 and R85 in toxin-RNA binding. In addition, they reveal the unexpected importance of T46 in RNA cleavage. The data are also consistent with similar modes of action in Kid, RNase A and RNase T1, as proposed previously [19], and give information on key Kid toxin residues involved in its RNase activity. The results further support the interrelations between the toxicity of the Kid protein, its RNase activity and its potential to inhibit protein synthesis. Because the RNase activity of the protein is involved in plasmid stability, we can predict that the mutations analysed will also affect this toxin role. Our results offer clues for comparison of the residues involved in the specificity of RNA cleavage within the toxin family and for the design of RNases based on the different cleavage efficiencies of Kid.

## Materials and methods

### Bacterial strains

The bacteria used in this study were *E. coli* K12 strains: OV2 (F, *leu*, *thyA*(deo), *ara* (am), *lac*-I25 (am), *galU*42, *galE*, *trp* (am), *tsx* (am), *tyr* (*supF*(*ts*)A81), *ile*, *his*), as a host for the plasmids pAB1120 and pBR1120 derivatives; TG1 (*supE*,  $\Delta$ (*lac-proB*), *thi*1, *hsd* $\Delta$ 5, *F'* (*traD*36, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*M15, *proAB*<sup>+</sup>)), was used for protein over production; MLM373 ( $\Delta$ (*lac*, *pro*), *supE*, *thi*) [20] was used for  $\beta$ -galactosidase assays.

### Plasmids used and constructed

The plasmids used and constructed are listed in Table 1.

**Table 1.** Plasmids used in this study.

Plasmid	Description	References
pAB1120	pAB112 (R1), <i>parD</i> ( <i>kis74amb,kid<sup>+</sup></i> ), <i>copB<sup>-</sup></i> , Km <sup>R</sup>	[34]
pAB 24	pKN1562 y pBR322 (pMB9), <i>parD<sup>+</sup></i> ( <i>kis, kid</i> ), Tc <sup>R</sup>	[3]
pBR322	pMB9, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	[35]
pAB17	pKN1562, <i>kis17</i> , Km <sup>R</sup>	[3]
pRG-his-KisKid	pRG-recA-Nhis, <i>precA::his<sub>G</sub>::parD<sup>+</sup></i> , Ap <sup>R</sup>	R. Sabariego-Jareño (unpublished data)
pRG-his-KisKidD75N	pRG-recA-Nhis, <i>precA::his<sub>G</sub>::kis, kidD75N</i>	This study
pRG-his-KisKidD75E	pRG-recA-Nhis, <i>precA::his<sub>G</sub>::kis, kidD75E</i>	This study
pRG-his-KisKidH17P	pRG-recA-Nhis, <i>precA::his<sub>G</sub>::kis, kidH17P</i>	This study
pRG-his-KisKidR73H	pRG-recA-Nhis, <i>precA::his<sub>G</sub>::kis, kidR73H</i>	This study
pRG-his-KisKidA55G	pRG-recA-Nhis, <i>precA::his<sub>G</sub>::kis, kidA55G</i>	This study
pRG-his-KisKidT69G	pRG-recA-Nhis, <i>precA::his<sub>G</sub>::kis, kidT69G</i>	This study
pRG-his-KisKidE5G	pRG-recA-Nhis, <i>precA::his<sub>G</sub>::kis, kidE5G</i>	This study
pAB24-D75N	pAB24 ( <i>kis, kidD75N</i> )	This study
pAB24-D75E	pAB24 ( <i>kis, kidD75E</i> )	This study
pAB24-H17P	pAB24 ( <i>kis, kidH17P</i> )	This study
pAB24-R73H	pAB24 ( <i>kis, kidR73H</i> )	This study
pAB24-A55G	pAB24 ( <i>kis, kidA55G</i> )	This study
pAB24-T69G	pAB24 ( <i>kis, kidT69G</i> )	This study
pAB24-E91K	pAB24 ( <i>kis, kidE91K</i> )	[24]
pAB24-R85W	pAB24 ( <i>kis, kidR85W</i> )	J. López-Villarejo (unpublished data)
pMLM132	<i>p<sub>parD</sub>::lacZ</i> , Tc <sup>R</sup>	[20]
pBR322-1120	pBR322, <i>parD</i> ( <i>kis74amb,kid<sup>+</sup></i> ), Cm <sup>R</sup>	S. Santos-Sierra (unpublished data)
pBR322-1120-D75E	pBR322-1120, <i>kis, kidD75E</i>	This study
pBR322-1120-H17P	pBR322-1120, <i>kis, kidH17P</i>	This study
pBR322-1120-R73H	pBR322-1120, <i>kis, kidR73H</i>	This study
pBR322-1120-T46G	pBR322-1120, <i>kis, kidT46G</i>	This study
pBR322-1120-A55G	pBR322-1120, <i>kis, kidA55G</i>	This study
pBR322-1120-T69G	pBR322-1120, <i>kis, kidT69G</i>	This study
pBR322-1120-T46G/T69G	pBR322-1120, <i>kis, kidT46GT69G</i>	This study
pBR322-1120-A55G/T69G	pBR322-1120, <i>kis, kidA55GT69G</i>	This study
pB24	pBR322-1120, <i>kis, kidR85W</i>	[24]
pAB1120-D75N	pAB1120, <i>kis74amb, kidD75N</i>	[20]

**Table 2.** Primers used in this study.

Name	Sequence (5'- to 3')	Description
PD75E(-)	TTGTACGTTGCGAACAACCCCGACAAT	Change GAT-GAA in D75 ( <i>kid</i> D75E)
PD75E(+)	ATTGTCCGGGTTGTTTCGAACGTACAA	Change ATC-TTC in D75 ( <i>kid</i> D75E)
PD75N(-)	TTGTACGTTGCAATCAACCCCGACAAT	Change GAT-AAT in D75 ( <i>kid</i> D75N)
PD75N(+)	ATTGTCCGGGTTGATTGCAACGTACAA	Change ATC-TTA in D75 ( <i>kid</i> D75N)
PR73H(-)	ACCACAGGTGTTGTACATTGCGATCAACC	Change CGT-CAT in R73 ( <i>kid</i> R73H)
PR73H(+)	GGTTGATCGCAATGTACAACACCTGTGGT	Change ACG-ATG in R73 ( <i>kid</i> R73H)
PH17P(-)	TCCTACCGCAGTCTGAGCAGCAGGGA	Change CAT-CCT in H17 ( <i>kid</i> H17P)
PH17P(+)	TCCCTGCTGCTCAGGACCTGCGGTAGGA	Change ATG-AGG in H17 ( <i>kid</i> H17P)
PA55G(-)	TTTGCCCGCACTGGCGGCTTTGCGGTGTC	Change GCC-GGC in A55 ( <i>kid</i> A55G)
PA55G(+)	GACACCGCAAAGCCGCGAGTGCGGGCAAA	Change GGC-GCC in A55 ( <i>kid</i> A55G)
PT69G(-)	TTGGCATACGTACCACAGTGTTGTAC	Change ACA-GGA in T69 ( <i>kid</i> T69G)
PT69G(+)	GTACAACACCTCCGGTACGTATGCCAA	Change TGA-TCC in T69 ( <i>kid</i> T69G)

Derivatives of pRG-his-KisKid, pAB24 and pBR1120 were constructed by site-directed mutagenesis using the primers listed in Table 2 and QuikChange® Site-Directed Mutagenesis or QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Stratagene kits (La Jolla, CA, USA).

### Proteins, DNA and RNA

Kid toxin, Kid mutants and His-tagged Kis were overexpressed from plasmids of the type pRG-his-KidKid. Purification was performed with a protocol identical to that

described previously [19,21]. The concentration of the proteins was calculated spectroscopically, taking into account their extinction coefficients.

For DNA binding assays a double-stranded DNA fragment of 175 bp was used which includes the *parD* operator–promoter region; this fragment was obtained by PCR amplification, as described previously [9], using as the template a pUC18 recombinant containing the *parD* sequences in a *Sau3A* fragment of mini R1 plasmid pKN1562.

For MS studies, a 30-bp DNA fragment which contains the region I of the *parD* promoter was used [9].

The single-stranded five-nucleotide RNA (5'-UUACU-3', 5'-AUACA-3'), RNA-dU (5'-AdUACA-3') oligonucleotides were obtained from Eurogentec S.A. (Liege, Belgium). A 10 mM stock solution in H<sub>2</sub>O was prepared.

### Western blot assays

TG1 strains containing the different pRG-his-KisKid plasmids were grown in rich medium. At  $D_{600}$  0.3 the cultures were induced with nalidixic acid (25 µg·mL<sup>-1</sup>). After 4 h of induction, 2 mL of culture was collected, centrifuged and resuspended in 200 µL of lysis buffer (0.05 M Tris/HCl, pH 6.8, 10% w/v SDS, 0.01 M EDTA, 25% w/v glycerol, 0.5 g<sup>-1</sup> bromophenol blue, 5% v/v β-mercaptoethanol).  $D_{600}$  was adjusted to 0.1 and identical samples were incubated for 10 min at 100 °C, loaded on a denaturing SDS/PAGE with 15% polyacrylamide, and the proteins separated by electrophoresis. The proteins were transferred onto a poly(vinylidene difluoride) membrane using Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). After blocking the membrane overnight with 10% non-fat dried milk in TBST (137 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.1% Tween), it was incubated for 60 min with anti-Kid, anti-Kis or anti-DnaK sera in TBST. The membrane was washed with TBST and incubated with an anti-rabbit IgG bound to horseradish peroxidase (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) for 60 min followed by an additional washing step. The proteins labelled with the antibody were revealed using an ECL detection kit and detected by autoradiography (AGFA Healthcare NV, Mortsel, Belgium). The membrane was reprobed by using different primary sera (anti-Kis, anti-Kid or anti-DnaK) after stripping the previous signal (stripping buffer described in ECL Plus; Amersham) and blocking the membrane as previously indicated.

### β-Galactosidase activity assays

For this experiment, MLM373 strain bearing pAB24 derivative plasmids and pMLM132 reporter plasmid (Table 1) were grown at 37 °C with shaking in LB medium containing tetracycline (10 µg·µL<sup>-1</sup>) and chloramphenicol

(20 µg·µL<sup>-1</sup>) until the cultures reached the mid-exponential phase. Levels of β-galactosidase expression were monitored as described previously [31]. Three independent values were obtained for each strain.

### Macromolecular mass spectrometry

MS studies were carried out in aqueous ammonium acetate (100 mM, pH 7.0). Kid:Kis molar ratios were 2 : 1, 1 : 1 and 1 : 2. The lowest concentration was 10 µM. Samples were incubated at 20 °C for 1 min. In Kid:Kis:DNA binding assays, a 30-bp fragment containing the perfect palindrome overlapping the -10 region of the promoter was used. The molar ratios of Kid : Kis : DNA in the experiment were 5 : 5 : 1. To monitor the binding of Kid to RNA, proteins and RNA were used at 15 µM. For RNA cleavage assays, proteins were used at 0.2 µM (for 5'-UUACU-3') or 20 µM (for 5'-AUACA-3') and RNAs at 50 µM. Nanoflow electrospray capillaries with an orifice of ~ 5 µm were made of borosilicate glass capillaries (Kwik-Fil, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) using a P-97 puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) and coated with a thin layer of gold (~ 500 Å) using an Edwards ScanCoat Six Pirani 501 sputter coater (Edwards High Vacuum International, Crawley, UK).

Native MS experiments were performed as described previously [9] using a nanoflow electrospray ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometer (Micromass LC-T; Waters, Manchester, UK) modified for high mass operation and operating in positive ion mode [32]. To monitor RNA cleavage by Kid protein a robotic chip-based ESI source (Nanomate; Advion Biosciences, Ithaca, NY, USA) was coupled to LC-T spectrometer. The ESI source was programmed to aspirate 2 µL, as described previously [33]. The samples were measured with a scan time of 2 s for a total of 10 min per sample. RNA binding properties of the different mutants were monitored with an LC-T spectrometer.

### MS data analysis

MS data of the different mutants were semiquantified to determine the relative binding percentage of the Kid dimer protein to one molecule of RNA. Data were accumulated over 2 min, averaged, smoothed and centred to obtain the area values using the software program MASSLYNX 4.0 (Waters). Total ion intensity for all the protein present was calculated by summing the intensity of all ions belonging to the Gaussian charge state envelope of the bound and unbound protein under study; bound protein was calculated by summing the intensity of the ions belonging to the Gaussian charge state envelope of the bound protein. The percentage of protein bound to RNA was the ratio between the value of bound protein and the total protein present in the sample. The relative percentage of binding was based



on three independent measurements, using as a measure of error their standard deviation.

Semiquantification of RNA products after cleavage by Kid was performed in different experiments. The 10 min data acquisitions were accumulated over 30 or 60 s, averaged, smoothed and centred, to obtain area values using the software program MASSLYNX 4.0 (Waters). Total ion intensity for each product was calculated by summing the intensity of all ions belonging to the Gaussian charge state envelope of the products under analysis and this value was added to that obtained for the non-processed RNA to give the intensity of the total RNA present in the measurement. The amount of intact RNA and RNA products was based on three independent measurements, using the standard deviation as the errors bars.

### Statistical analysis

All the data are represented by at least three independent measurements. For the significance of the RNA binding data, a Levene statistical was used for acceptance of variance equality. One-way ANOVA and Bonferroni analyses were used to evaluate the data to a 95% level of statistical significance.

### Protein synthesis assays

Reaction mixtures (10  $\mu$ L) contained components from the *E. coli* S30 Extract System for Circular DNA (Promega Corporation, Madison, WI, USA): 4  $\mu$ L S30 premix without amino acids, 3  $\mu$ L S30 extract, circular, 1  $\mu$ L amino acids minus methionine (1 mM), 3  $\mu$ Ci of [ $^{35}$ S]methionine and pBESTluc plasmid DNA (400 ng). The assays were started by adding chloramphenicol 1  $\mu$ g $\cdot$  $\mu$ L $^{-1}$  as a negative control or 1  $\mu$ L of purified Kid proteins diluted in 20 mM Hepes, 100 mM KCl (6, 3 and 1.5  $\mu$ M), followed by incubation for 60 min at 37 °C. The results were analysed by SDS/PAGE (10%).

### Toxicity assays

OV2 cells containing pBR1120 or pAB1120 derivative plasmids bearing the different mutations were grown at 30 °C to the mid-exponential phase in LB medium containing tetracycline (10  $\mu$ g $\cdot$  $\mu$ L $^{-1}$ ) or kanamycin (50  $\mu$ g $\cdot$  $\mu$ L $^{-1}$ ). These cultures were serially diluted and 7  $\mu$ L of the undiluted cultures and of each subsequent dilution were spotted ( $10^{-1}$  steps from left to right) onto two plates of the same solidified medium. The plates were incubated at 30 °C (active antitoxin Kis) or 42 °C (inactive antitoxin Kis74) overnight. A semiquantitative assessment of the relative levels of toxicity of the different mutants was derived by comparing the number of colonies and growth of the spots at the different levels of dilution.

### CD spectroscopy

CD measurements and thermal denaturation were carried out with 15  $\mu$ M of Kid and Kid mutant proteins, as previously described [20]. Deconvolution analyses of the profiles obtained were carried out using SOMCD (<http://geneura.ugr.es/cgi-bin/somcd/som.cgi?start=1>).

### Acknowledgements

RDO was supported by Project BFU2005-03911 from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC, Spain), BFU 2008-01566/BMC and CSD2008-00013 from the Ministry of Science and Innovation (MCIIN, Spain) and by a networking project of the CM (COMBACT, Comunidad de Madrid, Spain). EDN acknowledges the contribution of a predoctoral fellowship (BFI05.35) from the Basque Country Government, Spain and of a short term EMBO fellowship (ASTF No: 159-06) to visit and work at the Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics group at Utrecht University, the Netherlands. The technical assistance of Alicia Rodríguez-Bernabé and discussions with Marc Lemonnier, Ana María Hernández-Arriaga and Juan López-Villarejo, are kindly acknowledged. RB, AJRH, and MBK acknowledge support from the Netherlands Organization for Chemical Research (NWO/CW) and the Center for Biomedical Genetics. RHH vdH was supported by a VENI fellowship (700.54.402) from The Netherlands Organization for Scientific Research (NWO). This work in Utrecht was also supported by the Netherlands Proteomics Centre.

### References

- Ogura T & Hiraga S (1983) Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 4784–4788.
- Gerdes K, Rasmussen PB & Molin S (1986) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 3116–3120.
- Bravo A, de Torrontegui G & Diaz R (1987) Identification of components of a new stability system of plasmid R1, ParD, that is close to the origin of replication of this plasmid. *Mol Gen Genet* **210**, 101–110.
- Pandey DG & Gerdes K (2005) Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res* **55**, 78–89.
- Gerdes K & Wagner EG (2007) RNA antitoxins. *Curr Opin Microbiol* **10**, 117–124.

- 6 Gerdes K, Christensen SK & Lobner-Olesen A (2005) Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**, 371–382.
- 7 Van Melderden L & Saavedra De Bast M (2009) Bacterial toxin–antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet* **5**, e1000437, doi:10.1371/journal.pgen.1000437.
- 8 Ruiz-Echevarria MJ, Berzal-Herranz A, Gerdes K & Diaz-Orejas R (1991) The *kis* and *kid* genes of the *parD* maintenance system of plasmid R1 form an operon that is autoregulated at the level of transcription by the co-ordinated action of the Kis and Kid proteins. *Mol Microbiol* **5**, 2685–2693.
- 9 Monti MC, Hernandez-Arriaga AM, Kamphuis MB, Lopez-Villarejo J, Heck AJ, Boelens R, Diaz-Orejas R & Van den Heuvel RH (2007) Interactions of Kid–Kis toxin–antitoxin complexes with the *parD* operator–promoter region of plasmid R1 are piloted by the Kis antitoxin and tuned by the stoichiometry of Kid–Kis oligomers. *Nucleic Acids Res* **35**, 1737–1749.
- 10 Ruiz-Echevarria MJ, de-la-Cueva G & Diaz-Orejas R (1995) Translational coupling and limited degradation of a polycistronic messenger modulate differential gene expression in the *parD* stability system of plasmid R1. *Mol Gen Genet* **248**, 599–609.
- 11 Tsuchimoto S, Nishimura Y & Ohtsubo E (1992) The stable maintenance system *pem* of plasmid R100: degradation of PemI protein may allow PemK protein to inhibit cell growth. *J Bacteriol* **174**, 4205–4211.
- 12 Munoz-Gomez AJ, Lemonnier M, Santos-Sierra S, Berzal-Herranz A & Diaz-Orejas R (2005) RNase/anti-RNase activities of the bacterial *parD* toxin–antitoxin system. *J Bacteriol* **187**, 3151–3157.
- 13 Tsuchimoto S, Ohtsubo H & Ohtsubo E (1988) Two genes, *pemK* and *pemI*, responsible for stable maintenance of resistance plasmid R100. *J Bacteriol* **170**, 1461–1466.
- 14 Zhang J, Zhang Y, Zhu L, Suzuki M & Inouye M (2004) Interference of mRNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK. *J Biol Chem* **279**, 20678–20684.
- 15 Pimentel B, Madine MA & de la Cueva-Mendez G (2005) Kid cleaves specific mRNAs at UUACU sites to rescue the copy number of plasmid R1. *EMBO J* **24**, 3459–3469.
- 16 Ruiz-Echevarria MJ, de-la-Torre MA & Diaz-Orejas R (1995) A mutation that decreases the efficiency of plasmid R1 replication leads to the activation of *parD*, a killer stability system of the plasmid. *FEMS Microbiol Lett* **130**, 129–135.
- 17 Steyaert J (1997) A decade of protein engineering on ribonuclease T1 – atomic dissection of the enzyme–substrate interactions. *Eur J Biochem* **247**, 1–11.
- 18 Lacadena J, Martinez del Pozo A, Lacadena V, Martinez-Ruiz A, Mancheno JM, Onaderra M & Gavilanes JG (1998) The cytotoxin alpha-sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS Lett* **424**, 46–48.
- 19 Kamphuis MB, Bonvin AM, Monti MC, Lemonnier M, Munoz-Gomez A, Van den Heuvel RH, Diaz-Orejas R & Boelens R (2006) Model for RNA binding and the catalytic site of the RNase Kid of the bacterial *parD* toxin–antitoxin system. *J Mol Biol* **357**, 115–126.
- 20 Santos-Sierra S, Lemonnier M, Nunez B, Hargreaves D, Rafferty J, Giraldo R, Andreu JM & Diaz-Orejas R (2003) Non-cytotoxic variants of the Kid protein that retain their auto-regulatory activity. *Plasmid* **50**, 120–130.
- 21 Hargreaves D, Santos-Sierra S, Giraldo R, Sabariego-Jareño R, de la Cueva-Mendez G, Boelens R, Diaz-Orejas R & Rafferty JB (2002) Structural and functional analysis of the kid toxin protein from *E. coli* plasmid R1. *Structure* **10**, 1425–1433.
- 22 Masuda Y, Miyakawa K, Nishimura Y & Ohtsubo E (1993) *chpA* and *chpB*, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the *pem* locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. *J Bacteriol* **175**, 6850–6856.
- 23 Munoz Gomez A (2004) Identificación y caracterización de la actividad RNasa de las toxinas bacterianas Kid y ChpAK. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- 24 Lemonnier M, Santos-Sierra S, Pardo-Abarrio C & Diaz-Orejas R (2004) Identification of residues of the kid toxin involved in autoregulation of the *parD* system. *J Bacteriol* **186**, 240–243.
- 25 Heck AJ (2008) Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nat Methods* **5**, 927–933.
- 26 Sharon M & Robinson CV (2007) The role of mass spectrometry in structure elucidation of dynamic protein complexes. *Annu Rev Biochem* **76**, 167–193.
- 27 Prysak MH, Mozdierz CJ, Cook AM, Zhu L, Zhang Y, Inouye M & Woychik NA (2009) Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Mol Microbiol* **71**, 1071–1087.
- 28 Christensen-Dalsgaard M & Gerdes K (2008) Translation affects YoeB and MazF messenger RNA interference activities by different mechanisms. *Nucleic Acids Res* **36**, 6472–6481.
- 29 Pedersen K, Zavialov AV, Pavlov MY, Elf J, Gerdes K & Ehrenberg M (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* **112**, 131–140.
- 30 Diago-Navarro E, Mora L, Buckingham RH, Diaz-Orejas R & Lemonnier M (2009) Novel *Escherichia coli* RF1 mutants with decreased translation termination activity and increased sensitivity to the cytotoxic effect of the bacterial toxins Kid and RelE. *Mol Microbiol* **71**, 66–78.

- 31 Miller J (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 32 van den Heuvel RH, van Duijn E, Mazon H, Synowsky SA, Lorenzen K, Versluis C, Brouns SJ, Langridge D, van der Oost J, Hoyes J *et al.* (2006) Improving the performance of a quadrupole time-of-flight instrument for macromolecular mass spectrometry. *Anal Chem* **78**, 7473–7483.
- 33 van den Heuvel RH, Gato S, Versluis C, Gerbaux P, Kleanthous C & Heck AJ (2005) Real-time monitoring of enzymatic DNA hydrolysis by electrospray ionization mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* **33**, e96.
- 34 Bravo A, Ortega S, de Torrontegui G & Diaz R (1988) Killing of *Escherichia coli* cells modulated by components of the stability system ParD of plasmid R1. *Mol Gen Genet* **215**, 146–151.
- 35 Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL & Boyer HW (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95–113.
- 36 De Lano WL (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific, San Carlos, CA.

## Supporting information

The following supplementary material is available:

**Fig. S1.** Stability of the different Kid mutants.

**Fig. S2.** Formation of the Kid–Kis–*parD* complexes by Kid wild-type and mutants.

**Fig. S3.** Effect of the different Kid mutations shown in S2 on the activity of the *parD* promoter monitored by the synthesis of  $\beta$ -galactosidase.

**Fig. S4.** Interaction of dimers of Kid with a single RNA molecule.

**Fig. S5.** RNA cleavage assays with Kid wild-type and mutant proteins.

This supplementary material can be found in the online article.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.